



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Medicina Veterinaria

Escuela Profesional de Medicina Veterinaria

**Identificación inmunohistoquímica de las células
productoras de insulina y glucagón en páncreas de
alpacos (*Vicugna pacos*) jóvenes y adultas**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

AUTOR

Yesenia Beatriz GIRALDO CARRANZA

ASESOR

Miluska Beatriz NAVARRETE ZAMORA

Lima, Perú

2016



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Giraldo Y. Identificación inmunohistoquímica de las células productoras de insulina y glucagón en páncreas de alpacas (*Vicugna pacos*) jóvenes y adultas [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Escuela Profesional de Medicina Veterinaria; 2016.



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA



**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL
TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO**

En el Auditorio Principal de la Facultad de Medicina Veterinaria, el día miércoles 24 de noviembre de 2016, a las 16:00 horas, se constituyó el Jurado Examinador designado mediante Resolución Directoral N° 139-EPMV/FMV-2016, integrado por los siguientes profesores:

OLGA MIRTHA LI ELÍAS.
MILUSKA NAVARRETE ZAMORA
ALFONSO CHAVERA CASTILLO
BORIS LIRA MEJÍA

Presidente del Jurado
Asesora de la Tesis
Miembro del Jurado
Miembro del Jurado

Luego de la instalación del Jurado, a cargo del Presidente del Jurado y bajo la dirección del mismo, la Bachiller Doña: GERALDO CARRANZA, YESENIA BEATRIZ, para optar el Título Profesional de Médico Veterinario, procedió a sustentar públicamente la Tesis:

**"IDENTIFICACIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE LAS CÉLULAS
PRODUCTORAS DE INSULINA Y GLUCAGÓN EN PÁNCREAS DE ALPACAS
(Vicugna pacos) JÓVENES Y ADULTAS"**

Luego de absolver las preguntas del Jurado y del público asistente, el Jurado deliberó con la abstención reglamentaria del Asesor de la Tesis y acordó su APROBACIÓN por UNANIMIDAD, otorgándole la nota de DIECISÉIS (16).

Habiéndose aprobado la sustentación pública de la Tesis, el Presidente en representación del Jurado recomienda que la Escuela Académico Profesional de Medicina Veterinaria proponga la aprobación del TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO a la Facultad de Medicina Veterinaria y que ésta proponga al Rectorado el otorgamiento respectivo.

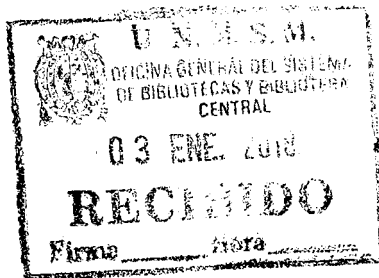
Siendo las 17:15 horas, concluyó el acto académico de sustentación pública de Tesis en fe de lo cual suscriben la presente acta por cuadruplicado los integrantes del Jurado:

Olga Mirtha Li Elías: Mg. Prof. Principal, D.E.

Miluska Navarrete Zamora: MV. Prof. Asociado, T.C.

Alfonso Chavera Castillo: MSc. Prof. Principal, T.C.

Boris Antonio Lira Mejía: Mg. Prof. Asociado, T.C.



Dedicatoria

A mis padres y Hermanos por ser mi soporte y compañía.

A Kevin Custodio por fortalecer y alegrar mi corazón desde el día en que nació.

A José Antonio, Hatsumi, Harumi, Matias, Vania, Ariana por ser mi alegría.

A Aurelia, Jaimito R., Américo y Elmer por su amistad.

Agradecimientos

A Wilmer Giraldo, Diana Giraldo, Marco García por su apoyo incondicional en la elaboración de este escrito.

A Miluska Navarrete y al equipo del proyecto porque son parte de su culminación.

A mi Universidad, a sus docentes y trabajadores por el apoyo brindado durante mi permanencia en esta casa de estudios.

Al Convenio 097-2014-FONDECYT-DE del FONDECYT por el financiamiento de la tesis.

CONTENIDO

LISTA DE CUADROS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	x
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	2
1. Generalidades	2
2. El páncreas.....	2
2.1. Anatomía macroscópica del páncreas.....	2
2.2. Anatomía microscópica del páncreas.....	3
3. El Islote Pancreático.....	4
3.1.1. Tipos celulares	5
3.2. Inervación	6
3.3. Vascularización de los islotes.....	6
4. El islote pancreático y la glucosa.....	7
4.1. Célula beta -insulina.....	8
4.2. Célula alfa-glucagón.....	8
5. Plasticidad del páncreas endocrino	9
6. Arquitectura y composición de los islotes pancreáticos en las diferentes especies ..	11
III. MATERIALES Y MÉTODOS	13
1. Material biológico.....	13
2. Metodología	13
2.1. Técnica de Inmunohistoquímica	14
2.2. Desarrollo del protocolo.....	14
2.3. Lectura de láminas	15
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	16
1. Caracterización de los islotes: Tinción Hematoxilina eosina.	16
2. Técnica Inmunohistoquímica (IHQ)	16
2.1. Grupo control	16
2.2. Patrón de distribución de células beta y alfa	17
2.3. Conteo de Islotes, células beta y células alfa en páncreas de alpacas	32
V. CONCLUSIONES.....	38

VI.	LITERATURA CITADA.....	39
VII.	ANEXO	44
	ANEXO 1. PROTOCOLO DE INMUNOHISTOQUIMICA ABC	44

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1.- Composición celular del islote pancreático en diferentes especies.

Cuadro 2.- Anticuerpos y Reactivos utilizados para la inmunohistoquímica en islotes endocrinos pancreáticos.

Cuadro 3.- Número de islotes por campo (100X) por subregiones en páncreas de alpacas. Promedio, (desvío estándar).

Cuadro 4.- Número de islotes por campo (100X) por regiones de páncreas en alpacas. Promedio (desvío estándar).

Cuadro 5.- Células beta por sub-regiones en perfiles de islotes en páncreas de alpaca (400X). Porcentaje (desviación estándar).

Cuadro 6.- Porcentaje de células beta por regiones en perfiles de islotes de páncreas de alpaca (400X). Promedio (desvío estándar).

Cuadro 7.- Número de células beta solitarias por campo (100X) en subregiones de páncreas exocrino de alpacas. Promedio, desvío estándar.

Cuadro 8.- Promedio de células beta solitarias por campo (100X) en regiones de páncreas exocrino de alpacas.

Cuadro 9.- Porcentaje de células alfa por subregiones en perfiles de islotes de páncreas en alpacas (400X).

Cuadro 10.- Porcentaje de células alfa por regiones en perfiles de islotes de páncreas en alpaca (400X) (%).

Cuadro 11.- Comparativo entre las poblaciones alfa y beta en perfiles de islotes en alpacas (400X) (%) Promedio (desvío estándar)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.- Opciones de destino durante el desarrollo normal de las células β . (Pagliuca y Melton, 2013)

Figura 2.- Estrategias para generar nuevas células beta. (Pagliuca 2013).

Figura 3.- Revelado: aplicación del DAB sobre tejido pancreático de alpaca, hasta observar marcación.

Figura 4.- Páncreas de alpaca (400X). Tinción H-E se observa un islote pancreático, de contorno irregular, rodeado de tejido exocrino.

Figura 5.- páncreas de rata (400x), técnica inmunohistoquímica, células alfa-glucagón en periferia del islote

Figura 6.- Páncreas de rata (400x), técnica IHQ, se observa islote compacto, células reacción positiva a insulina.

Figura 7.- Páncreas de alpaca joven (100X), IHQ, se observa distribución aleatoria de los islotes.

Figura 8.- Páncreas de alpaca joven, técnica IHQ (400X). Islote difuso de gran tamaño, conteniendo cientos de células., células positivo a insulina (<50%) formando grupos o dispersos.

Figura 9.- Páncreas de alpaca adulta, técnica IHQ (400X) distribución centrípeta de las células beta, rodeado de otras células endocrinas Se observan gránulos de insulina. Marcación 2= fuerte.

Figura 10.- Páncreas de alpaca adulta, técnica IHQ (400X), islote compacto con células beta de distribución central (>50%), rodeado de otros tipos celulares, marcación 2= fuerte

Figura 11.-Páncreas de alpaca adulta con IHQ (400X), mono capa de células beta rodeando células endocrinas no beta (derecha). Izquierda superior: células beta en el eje central del islote.

Figura 12.- Páncreas de alpaca adulta, técnica IHQ (400X), se observa células positivas a insulina en la periferia, región polar del islote y células hacia el centro, marcación 2= fuerte

Figura 13.- Páncreas de alpaca adulta, técnica IHQ (400X), islote compacto, con células beta en racimo (clusters), marcación 2= fuerte.

Figura 14.- Páncreas de alpaca joven, técnica IHQ (400X), con células beta en racimo y aisladas, en periferia, en centro y periferia del islote, marcación 2= fuerte.

Figura 15.- Páncreas de alpaca joven, técnica IHQ (400X), distribución de células beta en uno de los polos del perfil islotico y células beta individuales en tejido exocrino, marcación 2= fuerte.

Figura 16.- Páncreas de alpaca adulta, técnica IHQ (400X), células solitarias positivas a insulina dispersas al azar en el islote pancreático, marcación 2= fuerte.

Figura 17.- Páncreas de alpaca adulta, técnica IHQ (400X), células solitarias positivas a insulina, entre células del parénquima exocrino, marcación= 2.

Figura 18.- Páncreas de alpaca joven, técnica IHQ (400X) islote con células solitarias, insulina positiva, marcación = 1 (débil).

Figura 19.- Páncreas de alpaca joven, técnica IHQ (400X) con islote en tejido conectivo interlobulillar con células insulina positiva de distribución aleatoria, marcación= 2.

Figura 20.- Páncreas de alpaca joven, técnica IHQ (400X) islote mixto compacto con marcación =2 células positivas a glucagón, distribuidas en todo el islote, en la periferia y centro rodeando a otros tipos celulares que se hallan en menor proporción.

Figura 21.- Páncreas de alpaca adulta, técnica IHQ (400X), células alfa distribuidas en la periferia del islote rodeando a otras células endocrinas.

Figura 22.- Páncreas de alpaca adulta, técnica IHQ (400X), distribución periférica de células individuales con reacción positiva a glucagón en el perfil del islote pancreático.

Figura 23.- Páncreas de alpaca joven, técnica inmunohistoquímica (400X), reacción positiva a glucagón en células de la periferia y algunas en el centro del islote.

Figura 24.- Páncreas de alpaca joven, técnica IHQ (400X), islote difuso, distribución periférica de células glucagón positivos. Marcación= 1-2.

Figura 25.- Páncreas de alpaca adulta, técnica IHQ (400X), islote compacto con células alfa formando un cerco perimétrico continuo que rodea otros tipos celulares.

Figura 26.- Páncreas de alpaca adulta, técnica IHQ (400X), islote pancreático con células positivas a glucagón, de distribución periférica, marcación = 2.

Figura 27.- Páncreas de alpaca adulta, técnica IHQ (400X) islote compacto con células alfa individual o agrupados de dos, tres o más en la periferia.

Figura 28.- Páncreas de alpaca, técnica IHQ (400X), islote con células positivas a glucagón, marcación = 2

Figura 29.- Páncreas de alpaca joven, técnica IHQ (400X), reacción positiva débil a glucagón en células adyacente al conducto.

Figura 30.- Páncreas de alpaca adulta, técnica inmunohistoquímica (400X), reacción positiva débil a glucagón en células de islote adyacente a conducto.

Figura 31.- Páncreas de alpaca joven, técnica inmunohistoquímica (400X) reacción positiva a glucagón en células individuales del páncreas exocrino.

Figura 32.- Páncreas de alpaca adulta, técnica inmunohistoquímica (400X) islote compacto con células positivas a glucagón y célula solitaria entre células de los acinos (medio lateral izquierdo).

Figura 33.- páncreas de alpaca joven, técnica inmunohistoquímica < 2 años (400X), islote mixto con distribución aleatoria del componente alfa.

Figura 34.- Páncreas de alpaca joven, técnica inmunohistoquímica (400X,), islote mixto con distribución aleatoria de su componente celular positivo a glucagón. Marcación = 2.

Figura 35.- Páncreas de alpaca, técnica inmunohistoquímica (400X), islote con marcación = 0 para glucagón.

RESUMEN

El presente estudio tuvo por objetivo identificar células productoras de insulina y glucagón, además, de determinar el patrón de distribución en perfiles de islotes pancreáticos de alpacas jóvenes y adultas mediante técnicas de inmunohistoquímica. Para ello se emplearon muestras anatómicas de páncreas conservadas en formaldehído bufferado al 10% de 10 alpacas (entre 16 y 36 meses de edad). En cortes histológicos de 5µ con hematoxilina eosina, se observó células endocrinas de forma circular o piriforme con núcleo circular prominente. En nuestro estudio se usó un kit de inmunohistoquímica Santa Cruz Biotechnology, INC y un anticuerpo monoclonal insulín B: C12 para identificar las células beta y para detección de células alfa se empleó anticuerpo policlonal antiglucagón (US Biological Life Sciences) y kit Vectastain ABC KIT; la lectura de imágenes se realizó con ayuda de un microscopio óptico Leica ICCSO HD/DM750 con cámara digital acoplada y software. Se consideró en la lectura la marcación, como 0= sin marcación; 1= marcación débil; marcación 2= marcación moderada; 3= marcación fuerte. Se evaluaron un total de 1200 islotes. Se halló células beta (41.76%, 54.46%) y células alfa (44.47%, 35.13%), como los dos tipos celulares más importantes en número en islotes de páncreas de alpacas jóvenes y adultas, respectivamente. Se apreció marcación fuerte en las células productoras de insulina y marcación moderada en células alfa. Se concluye que los islotes pancreáticos, células beta y células alfa son observadas en todas las regiones del páncreas. Las células beta y alfa pueden estar distribuidas de forma aleatoria en gran parte de los islotes difusos de alpacas jóvenes y en alpaca adultas pueden estar entremezcladas, pero la mayor tendencia de las células beta es hacia el eje central y las células alfa tienen una predisposición mayor hacia la periferia del islote. Es recurrente la presencia de células beta y células alfa aisladas (solitarias) en tejido exocrino, entre los acinos, a nivel de los ductos y en el tejido interlobulillar.

Palabras Clave: Alpaca, glucagón, inmunohistoquímica, insulina, Islotes de Langerhans, páncreas.

ABSTRACT

The aim of the present study was to identify insulin and glucagon producing cells and to determine the pattern of distribution in pancreatic islets profiles of young and adult alpacas using immunohistochemical techniques. For this, anatomic samples of pancreas preserved in buffered formaldehyde were used at 10% of 10 alpacas (between 16 and 36 months of age). In histological sections of 5u with hematoxylin eosin, circular or piriform endocrine cells with prominent circular nuclei were observed. In our study, a Santa Cruz Biotechnology, INC immunohistochemistry kit and an insulin B: C12 monoclonal antibody were used to identify beta cells, and for the detection of alpha cells, a polyclonal antiglucagon antibody (US Biologolical Life Sciences) and Vectastain ABC KIT kit were used; The reading was performed using a microscope Leica ICCSO HD/DM750. The intensity of the qualitatively dialing classified as 0 = no marking; 1 = mild dial; and 2 = middle dial and 3= loud dialing. A total of 1200 islets were evaluated. Beta cells (41.76%, 54.46%) and alpha cells (44.47%, 35.13%) were found as the two most important cell types in young and adult alpaca pancreatic islets, respectively. Strong labeling is seen in insulin-producing cells and moderate labeling in alpha cells. It is concluded that pancreatic islets, beta cells and alpha cells are observed in all regions of the pancreas. Beta and alpha cells may be randomly distributed in most of the diffuse islets of young alpacas and adult alpaca may be intermixed, but the greater tendency of beta cells is towards the central axis and alpha cells have a greater predisposition Towards the periphery of the islet. The presence of beta cells and isolated (solitary) alpha cells in exocrine tissue, between the acini, at the level of the ducts and in the interlobular tissue, is recurrent.

Key words: Alpaca, beta cells, alpha cells, immunohistochemistry, Islet of Langerhans, pancreas.

I. INTRODUCCIÓN

Los camélidos sudamericanos resultan de vital interés para las comunidades que habitan las regiones Altoandinas, al ser motor de la economía de estos pobladores. Siendo una especie con peculiares características metabólicas, es de interés científico el ampliar los estudios en alpacas ya sea para fines económicos o de preservación de la especie.

El estudio de la cuantificación y clasificación de células, permite deducir acerca del crecimiento o desarrollo logrado de la alpaca en su entorno natural. El conocer la concentración de células, proporcionará información relevante acerca de la función del páncreas y en consecuencia del estado de salud de la alpaca.

El presente estudio pretende contribuir con conocimientos básicos acerca de la identificación de las células productoras de insulina y glucagón en los islotes pancreáticos de *Vicugna pacos*, para tener una mejor comprensión acerca de la tolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina, peculiares características presentes en esta especie.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. Generalidades

El páncreas es un órgano con función mixta. La función exocrina la lleva a cabo mediante la producción de jugo pancreático drenado a nivel del duodeno a través de conductos excretores. Este jugo depende de los acinos pancreáticos y está formado por agua, bicarbonato y numerosas enzimas digestivas (Karam, JH., 1996). La función endocrina es la responsable de producir y segregar, entre otras, dos hormonas importantes, la insulina y el glucagón a partir de los islotes pancreáticos.

2. El páncreas

2.1. Anatomía macroscópica del páncreas

La estructura de las vísceras y glándulas anexas del aparato digestivo de los camélidos sudamericanos, muestran diferencias morfológicas y funcionales, en relación a otros rumiantes, especialmente a los bovinos (Ghezzi *et al.*, 2000).

En la rata se observa un páncreas lobulado, aplanado y difuso. Se extiende dentro de una lámina de coalescencia que limita la cara posterior de la cavidad abdominal; limitado por la curvatura duodenal y ocupando la cara posterior del estómago. De color amarillo pardo con una textura laxa, se halla rodeado por tejido adiposo del cual a veces es difícil de distinguir. Su naturaleza difusa le confiere múltiples ductos largos, entre dos y ocho, que confluirán al conducto biliar común (De Sharp y Villano, 2013). La división de las diferentes secciones del páncreas variará según el autor, se diferencia el cuerpo, sección proximal al duodeno (también llamada cabeza pancreática, lóbulo derecho o segmento parabiliar común y duodenal) y la

sección distal, también llamada cola, lóbulo izquierdo o parte terminal del segmento esplénico (Vladimir, 2000).

El páncreas en la alpaca, se encuentra ubicado a nivel de la región del epigastrio dorsal, envuelto y fijado a los órganos que lo rodean por el mesoduodeno, omento mayor, ligamento gastroesplénico y mesocolon. De un color rosado pálido, de bordes irregulares y de apariencia lobular (Panesi, 2016). Aplanado dorso ventralmente, de consistencia blanda que varía del tono rosado claro al intenso (Málaga, 1976).

La forma del páncreas de la alpaca asemeja una “Y” invertida, dividido en cuerpo y lóbulos derecho e izquierdo. El lóbulo izquierdo es el más desarrollado y está relacionado al primer compartimiento del estómago, bazo, colon descendente y polo craneal del riñón izquierdo. El cuerpo se encuentra relacionado al primer compartimiento del estómago y rodea a la vena porta. El lóbulo derecho está fijado por el mesoduodeno, relacionado al lóbulo derecho del hígado y duodeno. Entre el lóbulo derecho y el hígado se observó unos lobulillos de color ámbar (Chávez *et al.*, 2015).

El conducto hepato-pancreático de los camélidos actúa funcionalmente como en la oveja y la cabra, dado que al terminar en un conducto común, las secreciones pancreáticas entran a la luz intestinal junto con la bilis; y al carecer de vesícula biliar y, aparentemente, el esfínter de este conducto no es funcional, la bilis es secretada hacia el intestino durante las fases del ciclo digestivo como ocurre en el equino (Ghezzi *et al.*, 2000).

La irrigación de este órgano está dada por la arteria pancreática duodenal craneal. La cual irriga al cuerpo y lóbulo derecho. La arteria pancreática duodenal caudal que irriga al lóbulo izquierdo junto con ramas provenientes de la arteria esplénica. La innervación del páncreas está a cargo de las fibras autónomas que nacen del plexo iliaco (Panesi, 2016).

2.2. Anatomía microscópica del páncreas

La morfogénesis y la diferenciación del páncreas y sus tipos celulares son muy conservados entre los vertebrados durante el desarrollo fetal. El páncreas se desarrolla como una estructura de yemas simples en el tubo del intestino primitivo a un órgano muy ramificado con muchos tipos de células especializadas (Kim y Mac Donald., 2002). Los tres tipos celulares más importantes del páncreas -las células ductales, acinares y endocrinas- tienen un origen embriológico común a pesar de tener estructura y funciones claramente diferenciadas (Noguchi, 2010)

Durante el desarrollo, las células del embrión fertilizado seleccionan primero la capa germinal de destino (ectodermo, mesodermo o endodermo); las células beta se derivan de la capa endodérmica. Después de la especificación endodérmica, las señales de los tejidos en

desarrollo adyacentes inducen especificación de progenitores pancreáticos que tienen el potencial para generar los tres tipos de células pancreáticas: ductal, acinares y endocrinos. El tejido exocrino de páncreas se compone de células ductales y acinares, mientras que los islotes proporcionan la función endocrina del páncreas. Después de la selección del destino endocrino, los progenitores endocrinos continúan diferenciándose para convertirse en uno de los cinco tipos de células endocrinas de los islotes: las células beta productoras de insulina, las células alfa productoras de glucagón, células delta productoras de somatostatina, las células polipéptido pancreáticas o varepsilon, células productoras de grelina (Pagliuca y Melton, 2013) (Figura 1).

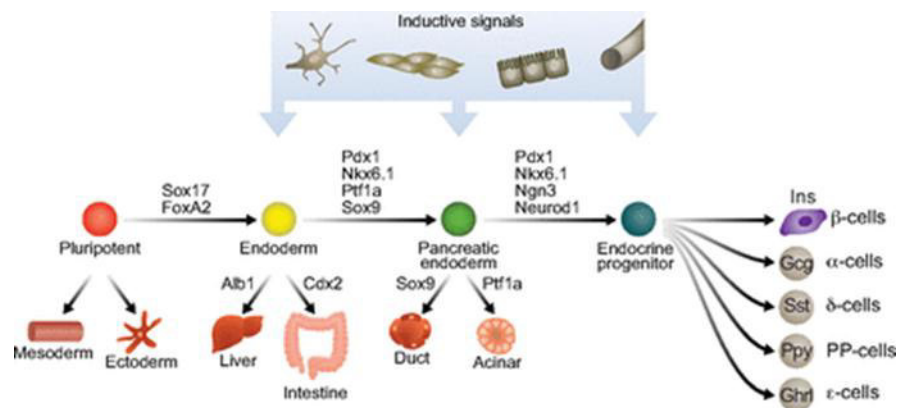


Figura 1.- Opciones de destino durante el desarrollo normal de las células β . (Pagliuca y Melton, 2013).

En alpacas, el parénquima pancreático está rodeado por una fina capa de tejido conectivo rico en fibras colágenas que se invagina dentro del parénquima formando lóbulos y pseudolóbulos. Los acinos que forman el parénquima presentan células de aspecto piramidal con núcleo redondo central basófilo y citoplasma teñido de rosado. Los conductos intralobulares e interlobulares presentan epitelio cúbico simple, mientras que el conducto hepatopancreático está conformado por una extensa mucosa irregular tapizada de epitelio columnar con vellosidades. Distribuidos al azar por todo el parénquima hallamos una agrupación de células que constituyen los Islotes de Langerhans. (Panesi, 2016).

3. El Islote Pancreático

Descubiertos en 1869 por Paul Langerhans, sería Von Mering y Oscar Minkowski que revelaron su función endocrina en 1889. En 1894, Laguesse atribuía esta función a los islotes y

les daba el nombre de islotes de Langerhans haciendo honor a su descubridor (Busnardo *et al.*, 1983).

Los islotes son fácilmente ubicados en ambos lóbulos y se encuentran al azar sin relación alguna con el sistema de conductos y su distribución es uniforme lo cual es similar en otras especies (Xu *et al.*, 1999; Cebra *et al.*, 2006). Éstos están ubicados en el tejido intralobular y no en el interlobular como en el ganado vacuno (Bonner y Like, 1980; Cebra *et al.*, 2006). Dos tipos de islotes son reconocidos: el difuso y el compacto. Los islotes son del tipo difuso, porque las trabéculas parecen ser más laxas que en los islotes que se encuentran en el resto del páncreas y que se conocen como islotes compactos. Los islotes difusos son más grandes que los islotes compactos. En bovinos, la población relativa de islotes grandes disminuye con la edad (Steiner *et al.*, 2010). En la mayoría de las especies los islotes compactos están bien circunscritos y separados del tejido exocrino por una delgada capa de colágeno. Esto es menos en el caso de los islotes difusos. Los islotes compactos más grandes, son generalmente considerados hiperplásicos (Klimstra *et al.*, 2007). Las células endocrinas forman agregados de varios tamaños y aspectos microscópicos, y el tamaño del islote y el número de células β aumenta desde el nacimiento a la adultez (Meier *et al.*, 2008).

3.1.1. Tipos celulares

Los islotes adultos contienen por lo menos cinco tipos diferentes de células endocrinas. Las células alfa y beta fueron descritas por primera vez en 1907 por Lane (Lane, 1907) en función de sus características histoquímicas de tinción, mientras que las células delta fueron reconocidas por primera vez por Bloom en 1931. Las células PP (Kimmel *et al.*, 1971) y las células Ghrelin (Wierup *et al.*, 2002), ambas fueron descubiertas gracias a la ayuda de la inmunocitoquímica.

Los diferentes tipos celulares, cada uno responsable de la liberación de una hormona específica. La acción coordinada de todas ellas garantiza un correcto mantenimiento de la homeostasis de la glucosa plasmática, siendo:

- Células beta (β): Secretoras de insulina, las más numerosas, conforman alrededor del 60% del islote en humanos y hasta el 80% en roedores.
- Células alfa (α): Secretoras de glucagón, segundo tipo celular más abundante, en torno al 20% en roedores, pudiendo llegar a alcanzar el 45% en humanos. Estos datos sugieren una mayor relevancia de este tipo celular en el islote humano.
- Células delta (δ): Secretoras de somatostatina (3-10% del total de células).
- Células PP: Secretoras de Polipéptido Pancreático (3- 5%).

- Células Epsilon (ϵ): Secretoras de grelina (menos del 1%). Están presentes de manera destacable durante el desarrollo fetal, aunque su número desciende de forma drástica después del nacimiento (Elayat *et al.*, 1995; Wierup *et al.*, 2002).

En alpacas, la porción endocrina está formada por un conjunto de células endocrinas, con una rica vasculatura, evidenciado por racimos de células sanguíneas y células endoteliales. Los islotes presentan variados tamaños, forma y su distribución en el parénquima pancreático es irregular (Panesi, 2016).

3.2. Inervación

Los islotes poseen una gran inervación nerviosa, procedente tanto del sistema simpático como parasimpático, la rama parasimpática es la principal implicada en el proceso de control de la secreción hormonal (Rossi *et al.*, 2005). La inervación es determinante en la respuesta secretora rápida del islote, por ejemplo en respuesta a bajas concentraciones de glucosa (Taborsky *et al.*, 2010).

3.3. Vascularización de los islotes

Durante la formación del páncreas los vasos sanguíneos, cumplen un rol importante, no solo aportan nutrientes esenciales y el intercambio gaseoso, además proporcionan señales no nutricionales que juegan un papel clave en el control del crecimiento del órgano, la morfogénesis y la homeostasis. Esta red de vasos en la mayoría de las especies, suministra sangre en primer lugar a las células beta de los islotes y posteriormente a las alfa, provocando la exposición de éstas últimas a las secreciones de las células beta que suprimen tónicamente la secreción de glucagón. La sangre que sale de los islotes drena en la vena porta y luego llega al hígado (Taborsky *et al.*, 2010; Cleaver y Dor, 2012).

Los islotes ricamente vascularizados, reciben 20 veces más flujo sanguíneo que la porción exocrina del páncreas (Lifson *et al.*, 1985). El orden de perfusión de los distintos tipos celulares presentes en el islote no es aleatorio. La circulación de la sangre va sentido beta, alfa, delta, épsilon, finalizando en las células peri-insulares (Papaccio, 1993). Las células beta se encuentran comunicadas entre sí, mediante “gap junctions” (uniones en hendidura), lo que les permite responder a los estímulos de forma sincronizada. Por su parte las células alfa mantienen un funcionamiento individual y aparentemente carecen de acoplamiento intercelular (Nadal *et al.*, 1999; Quesada *et al.*, 2008). La estructura del islote y los estudios realizados sobre microcirculación sanguínea sugieren una importante comunicación paracrina intercelular entre beta y alfa (Bonner-Weir *et al.*, 1989; Unger y Orci, 2010).

4. El islote pancreático y la glucosa

La regulación de la glucemia por parte del islote depende principalmente de la función individual de las diferentes poblaciones celulares que lo integran y de la interacción entre éstas. El tipo celular predominante corresponde a la célula beta-pancreática, mientras que la célula alfa secretora de glucagón y la delta secretora de somatostatina están representadas en una menor proporción. Mientras que la célula beta libera insulina con concentraciones crecientes de glucosa, la secreción de glucagón por parte de la célula alfa tiene lugar en condiciones hipoglucémicas. La población delta ejerce una función reguladora indirecta a través de mecanismos paracrinós ya que la somatostatina inhibe la secreción de las células alfa y beta. Además de la función y la interacción de estos tipos celulares, la regulación de la glucemia está también sometida a varios niveles de control neuronal y hormonal. Tanto la población de células delta como alfa, funcionan como unidades individuales a diferencia de lo que ocurre en la célula beta que se comporta como un sincitio en ratón o en pequeños grupos coordinados en humano (Barberá y Gasa, 2007).

Las condiciones fisiológicas del metabolismo hidrocarbonado se ven alteradas por procesos adaptativos a las variantes quirúrgicas. Estos, provocan cambios en los parámetros del metabolismo de la glucosa, con un marcado carácter temporal y evolutivo. Una expresión de los mecanismos responsables de estímulo sobre el páncreas endocrino deben estar mediados, en los casos de resecciones masivas y de exclusión duodenoyeyunal, por las modificaciones funcionales que se ponen de manifiesto en los fenómenos secundarios y transitorios de intolerancia a la glucosa. Por el contrario, la cirugía que afecta solo al estómago no provoca dicha intolerancia (Camacho, 2015).

En alpacas el metabolismo de la glucosa es poco conocido, sus condiciones energéticas difiere al de otras especies. En rumiantes la glucemia (47-80 mg/dl) está por debajo de los no rumiantes (caballo: 80-115mg/dl; cerdo: 150mg/dl) (Kaneko, 1989). Los niveles de glucemia en alpacas (media: 126mg/dl) son similares al de los monogástricos. Aunque existen ciertas diferencias entre los rangos de laboratorio, todas evidencian altas concentraciones para las alpacas en comparación con los rumiantes (Lassen *et al.*, 1986; Fowler y Zinkl, 1989; Kaneko, 1989). El estrés en llamas y alpacas alcanzan niveles glucémicos muy elevados (200-290mg/dl) (Fowler y Zinkl, 1989; Cebra *et al.*, 2001 a,b). Estos niveles en llamas y alpacas pueden ser explicados por una respuesta a la insulina lenta y moderada algo similar a una condición de diabetes (Cebra *et al.*, 2001a,b).

4.1. Célula beta -insulina

El grupo celular de mayor abundancia en el páncreas endocrino está conformado por las células β (entre el 50 y 80% del total celular) (Brissova *et al.*, 2005; Cabrera *et al.*, 2006).

La célula beta juega un papel central en la homeostasis de los nutrientes que llegan al organismo a través de la dieta, no solo por ser capaz de fabricar y secretar la insulina, sino además por hacer que dicha secreción sea en el momento justo y la cantidad adecuada. En circunstancias en la que los nutrientes: glucosa y ácidos grasos están elevados de forma crónica, éstos se convierten en sustancias tóxicas que con el tiempo pueden llegar a provocar la muerte de la propia célula beta. Dado que no existe ninguna hormona que pueda reemplazar funcionalmente a la insulina, aparece la diabetes tipo 2. Cuando esta se declara se observan ciertos puntos coincidentes con la diabetes tipo 1. Así por ejemplo, en ambos casos la célula beta sufre una destrucción, aunque en el caso de diabetes tipo 1 es por causas autoinmunes. Actualmente, el concepto emergente es glucolipototoxicidad, en el que las concentraciones elevadas tanto de glucosa, como de ácidos grasos conjuntamente serían la causa real y particular de la disfunción de la célula beta en la diabetes tipo 2. En estas circunstancias, cuando ambos nutrientes están presentes y elevados al mismo tiempo, la célula beta no puede activar correctamente su respuesta adaptativa y su capacidad detoxificadora (Roche, 2007).

4.2. Célula alfa-glucagón

El glucagón, se encuentra almacenado en el interior de la célula alfa, en forma de gránulos electrodensos, con un manto periférico característico (Deconinck *et al.*, 1971). El glucagón es la hormona contrareguladora de la insulina, que junto a ésta se encarga del mantenimiento del equilibrio homeostático de la glucosa (Duning y Gerich, 2007). Aunque actúa sobre múltiples tejidos, su principal diana metabólica es el hígado, donde estimula la glucogenolisis y la gluconeogénesis, e inhibe a su vez la glucolisis y glucogenogénesis. De esta manera el glucagón favorece la movilización y producción hepática de glucosa, inhibiendo el almacenamiento de la misma. Además, existen estudios realizados en ratón que demuestran que el glucagón inhibe la síntesis y secreción de triglicéridos y favorece la lipólisis (Slavin *et al.*, 1994; Longuet *et al.*, 2008).

En estudios sobre parámetros morfológicos en ratones obesos, éstos presentan hipotrofia de las células alfa, así como una reducción del área pancreática ocupada por células alfa y una disminución en la proliferación, acompañada de un aumento en la apoptosis. Resultados del estudio indicaron que, al igual que se ha descrito para la célula beta pancreática, existe una adaptación compensatoria también en célula alfa durante los estadios prediabéticos

asociados a obesidad. Además, algunos de estos cambios en la función celular, pueden suponer factores importantes a tener en cuenta en la progresión de la Diabetes de tipo 2 (Merino, 2015).

Unger y Cherrington, 2012 argumentan que “El exceso de glucagón y la falta de insulina son condición sine qua non para el desarrollo de diabetes”. El mecanismo por el que la hiperglucemia no es capaz de inhibir la secreción de glucagón por parte del páncreas no está claramente demostrado. Algunos autores apuntan a que la célula alfa podría ser insensible a la señal paracrina de insulina o resistente a los altos niveles de glucosa (Cryer, 2002; Quesada *et al.*, 2008).

5. Plasticidad del páncreas endocrino

El páncreas endocrino está en constante remodelación mediante un proceso dinámico, en el cual participan tanto la regeneración como la muerte celular. Existen numerosos factores genéticos, metabólicos y ambientales que afectan este proceso de remodelación. Los mecanismos de adaptación de la célula beta funcionalmente aunque son diversos, no son mutuamente excluyentes y pueden actuar simultáneamente. Tanto la involución como la expansión de la célula beta no solo conlleva cambios en el número de células, sino también en el tamaño celular mediante el aumento (hipertrofia) o disminución (atrofia) del volumen celular. Además de estos mecanismos compensatorios, que actúan a medio o largo plazo, no debemos olvidar que existen otros mecanismos a corto plazo que permiten adaptar la funcionalidad de la célula beta a las variaciones en las necesidades metabólicas del organismo. Por ejemplo la célula beta puede aumentar su capacidad de secretar insulina usando una gran variedad de complejos mecanismos como un aumento en la síntesis y secreción de insulina o la variación del umbral de respuesta a los diferentes estímulos. (Barberá y Gasa, 2007).

En referencia a los mecanismos que controlan la masa de célula beta, el número absoluto de células beta puede aumentar mediante dos mecanismos: replicación y neogénesis. La replicación consiste en la división de una célula beta funcional para obtener dos nuevas células beta. Estudios en ratón adulto, demuestran que todas las células beta comparten la capacidad replicativa. Por otro lado, la neogénesis se refiere a la formación de nuevas células beta a partir de precursores no endocrinos; el proceso requiere la proliferación de estos precursores y una posterior diferenciación de éstos hacia células beta-funcionales. La naturaleza de estos precursores no ha sido determinada con claridad, pero diferentes estudios sugieren que se encontrarían en el ducto pancreático y serían de origen epitelial. El aumento en la masa de células beta por replicación o neogénesis puede ser contrarrestado por la disminución del

número celular mediante la muerte celular por apoptosis o necrosis (Figura 2) (Barberá y Gasa., 2007; Pagliuca, 2013).

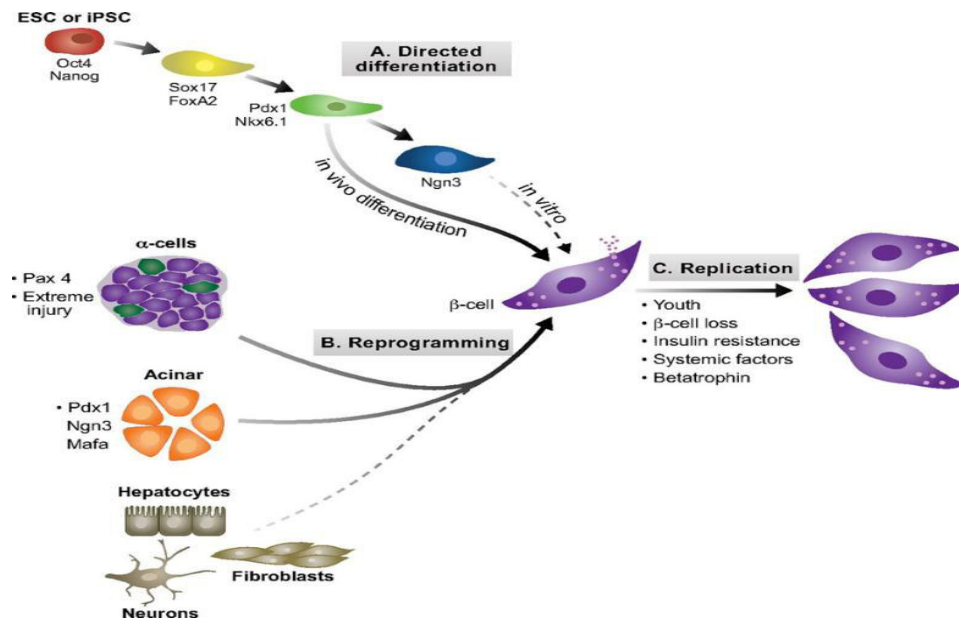


Figura 2.- Estrategias para generar nuevas células beta (Pagliuca, 2013).

La apoptosis o muerte celular programada permite moldear el tejido pancreático durante la organogénesis y la vida del individuo; además juega un papel fundamental en modular la expansión y posterior involución de la masa celular beta en la diabetes tipo 2. La regulación de la masa de células beta es un proceso complejo y genéticamente heterogéneo. Estos mecanismos de expansión e involución pueden variar considerablemente, incluso en un mismo individuo, en condiciones fisiológicas diversas. Mediante estudios morfométricos, en roedores, se ha determinado la tasa de replicación de la célula beta, la cual disminuye del 4% por día en animales jóvenes (1 mes de edad) hasta valores menores al 0.5% en ratas adultas. (Barberá y Gasa, 2007).

La diferencia entre ratones y humanos puede modificar la posible contribución de la neogénesis en la homeostasis de la masa de célula beta en el humano, ya que en este existe una población de células beta aisladas, fuera del islote distribuidas por el tejido exocrino, esta población celular es casi inexistente en roedores. Estos datos morfológicos pueden sugerir que la neogénesis si tiene lugar en humanos. El páncreas a diferencia de otros órganos, tiene una capacidad regenerativa muy limitada. Esto se debe probablemente a una baja tasa de replicación

o a la dificultad de reactivar la neogénesis. Sin embargo en determinadas situaciones se ha podido reactivar la capacidad regenerativa del páncreas. En todos los casos, después de inducir daño en el tejido (tóxicos químicos o por cirugía) se produce un aumento en la capacidad mitótica del páncreas produciéndose una regeneración parcial del páncreas exocrino y endocrino. Además se ha demostrado que existen sustancias capaces de estimular procesos regenerativos cuando se administran a estos modelos animales. La administración de GLP-1 a animales pancreatectomizados estimula la regeneración del páncreas mediante la estimulación de la célula beta tanto por replicación como por neogénesis. La betacelulina, un factor de crecimiento de la familia de los EFGs (factores de crecimiento epidermal) promueve la regeneración de la célula beta tanto en ratas pancreatectomizadas como en ratones prefundidos con aloxano. También la combinación de diferentes factores, como por ejemplo gastrina y EGF, inducen el aumento de célula beta en ratones tratados con aloxano o en ratones con ligación en el ducto. En este último caso la regeneración se produce principalmente por la estimulación de los mecanismos neogénicos (Barberá y Gasa, 2007).

6. Arquitectura y composición de los islotes pancreáticos en las diferentes especies

En relación al patrón de distribución de los diferentes tipos celulares se observa una variación en las diferentes especies. En el caballo el centro del islote pancreático es predominantemente ocupado por células alfa, rodeado por un más o menos completo manto de células beta, las células delta y las células productoras del polipéptido pancreático se hallan en pequeñas cantidades en la frontera entre las células alfa y beta. En los bovinos las células beta se distribuyen en todo el islote, las células del polipéptido pancreático están bien distribuidas en forma de racimos y los otros tipos celulares ocuparon una ubicación más periférica y en escaso número. En los bovinos las células beta se distribuyen en todo el islote. En el camello, las células beta se distribuyeron en todo el islote en el centro y la periferia, también se encontraron fuera de los márgenes del islote entre los acinos y el tejido conectivo interlobulillar, las células alfa eran en su mayoría observados como grumos en la periferia (Hafez *et al.*, 2015).

Los componentes celulares beta y alfa en humanos se encuentran en el núcleo y la periferia del islote, distribuidos aleatoriamente. En primates no humanos, las células alfa se encuentran en el interior y las células beta periféricamente. Perros y gatos domésticos presentan las células beta en el núcleo del islote y las células alfa en la periferia, las células alfa en gatos también pueden estar como racimos en los islotes o individuales en conductos. En el bovino las

células beta centrales están rodeadas parcialmente de un manto de células alfa y a veces se extienden a la periferia (Steiner *et al.*, 2010).

En el murciélago las células beta se encuentran en todo el islote y las células alfa en la periferia irradiando hacia dentro. Las aves incluyen tres tipos de islotes: Dark tinción, que consisten en islotes de células alfa y delta, con algunas células beta aisladas; Ligh-tinción, islotes de células beta pericapilar con una fina capa de células delta en la periferia; y por último islotes de células alfa beta y delta entremezcladas (Steiner *et al.*, 2010).

Estudios en diferentes especies indican una variación en el número de células productoras de insulina y glucagón, así como la ubicación de estas células y la distribución de las mismas en las diferentes porciones del páncreas. En el perro, las células beta constituyen el 75% de la población celular de los islotes, en la oveja el 98%. Las células alfa normalmente suponen el 25% de la población de los islotes; en el cerdo pasan de un 50% en el momento del nacimiento a un 10 o 20% en el adulto; falta en los islotes del lóbulo derecho del perro (Climent *et al.*, 2005).

Steiner *et al.*, 2010 en una revisión sobre la plasticidad de los islotes, que incluyen cambios en respuesta a estados metabólicos; recopila datos de la composición celular entre las diversas especies (cuadro 1):

Cuadro 1.- Composición celular del islote pancreático en diferentes especies				
Especie	B eta %	Alfa %	Delta %	PP %
Humanos	54	36	10	<5
Perro	>50	<30	<15	<4
Gato	60	30	4	1
Marsupiales	8-15	70		
Rata	60-80	15-20	<10	<1
Murciélago	50	30	10	15
Aves	70	15	22	11

Fuente: (Steiner *et al.*, 2010).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material biológico

Se emplearon muestras anatómicas de páncreas conservadas en formaldehído bufferado al 10% de 10 alpacas de descarte entre jóvenes y adultas de raza huacaya de la estación experimental IVITA-MARANGANÍ de la provincia de Canchis en el departamento del Cusco los cuales se dividieron en los siguientes grupos de estudio:

- Grupo 1: Jóvenes. Conformado por 5 animales machos de aproximadamente 16 a 18 meses.
- Grupo 2: Adultos. Conformado por 5 animales. 2 machos y 3 hembras entre 24 a 36 meses.

Términos de ética: todas las muestras empleadas en el presente estudio fueron obtenidas de alpacas destinadas al consumo humano.

2. Metodología

Para la reducción de muestras de páncreas se consideraron tres regiones:

- Lóbulo izquierdo (LI): subdividido en base, medio y extremo.
- Lóbulo derecho (LD): subdividido en base, medio y extremo.
- Cuerpo (C): subdividido en base y extremo.

Para el procesamiento de láminas se consideraron 08 muestras por animal, tomando de referencia las subdivisiones antes mencionadas. Se usó la tinción de hematoxilina-eosina para evaluar los tejidos que fueron sometidos a las técnicas con inmunohistoquímica (IHQ). Se obtuvieron cortes histológicos de 5µm de espesor en láminas positivadas para su procesamiento en IHQ (Taniyama *et al.*, 1999; Zanuzzi, 2010). Para validar el anticuerpo, se empleó como control positivo, cortes de páncreas de rata albina (Elayat *et al.*, 1995), mientras que el control negativo interno fue la no marcación de productos sanguíneos en el corte histológico.

2.1. Técnica de Inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica fue la técnica utilizada en el presente estudio. Para la identificación de células productoras de insulina se empleó anticuerpo monoclonal de ratón y anticuerpo policlonal para determinar células productoras de glucagón (Cuadro 2)

Cuadro 2.- Anticuerpos y Reactivos utilizados para la inmunohistoquímica en islotes endocrinos pancreáticos.

Anticuerpo	Laboratorio
Insulin B (C-12) Catálogo N°SC 377071	Santa Cruz Biotechnology, INC. www.scbt.com
Rabbit anti Glucagon Catálogo N°G2040-03D	US Biollogical Life Sciences Salem, MA. 01970
ImmunoCruz™ mouse ABC Staining Catálogo No. sc-2017	Santa Cruz Biotechnology, INC. www.scbt.com
Vectastain ABC KIT	Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA 94010
ImmPACT™ DAB Peroxidase Substrate Catálogo No. SK-4105	Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA 94010

2.2. Desarrollo del protocolo

Los cortes histológicos embebidos en parafina y dispuestas en láminas positivadas fueron sumergidas en sustituto de xileno (Neo Clear ®) y se rehidrataron en alcohol (100%). El bloqueo de la peroxidasa endógena se realizó durante 30 minutos en metanol mezclado con agua oxigenada. Continuamos con la rehidratación en soluciones de alcoholes de concentración cada vez más diluidas (96°, 70° y 50°). Se empleó PBS (tampón fosfato salino) para los lavados. Para la recuperación antigénica los portaobjetos fueron sumergidos en buffer citrato + HCl (pH=6),

llevados a horno microondas a 750 watts por 10 minutos para luego enfriar a medio ambiente. Se hicieron lavados en PBS y se aplicó albúmina sérica bovina (BSA 1%) con el fin de saturar las uniones de los anticuerpos con proteínas y evitar las uniones inespecíficas, se dejaron incubar por 30 minutos y se realizaron lavados en PBS.

Luego las secciones se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente en una cámara húmeda durante la noche a 4 grados centígrados en refrigeración. Seguido a esto se lavaron en PBS y se les aplicó el anticuerpo secundario según el kit para monoclonal o policlonal, se dejó incubar a temperatura ambiente por 30 minutos. Se realizó lavados y se aplicó la enzima AB (incubado a 30 minutos). Para el revelado se empleó diaminobencidina (DAB), durante 10 minutos en el caso de insulina y 7 minutos en el caso de glucagón (Figura 3). Para el contraste, las láminas fueron sumergidas en Hematoxilina de Harris durante 5 segundos, fijadas, deshidratadas y despejadas en sustituto de xileno (Neo Clear ®). Finalmente se realizó el montaje con bálsamo de Canadá usando láminas cubreobjeto.



Figura 3.- Revelado: aplicación del DAB sobre tejido pancreático de alpaca, hasta observar marcación.

2.3. Lectura de láminas

Lectura de imágenes se realizó con ayuda de un microscopio óptico Leica ICCSO HD/DM750 con cámara digital acoplada y software. Se consideró en la lectura la marcación, como 0= sin marcación; 1= marcación débil; marcación 2= marcación moderada; 3= marcación fuerte (Taniyama *et al.*, 1999; Zanuzzi, 2010). Los resultados se expresaron en porcentajes y desviación estándar.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Caracterización de los islotes: Tinción Hematoxilina eosina.

En la caracterización se observó islotes pancreáticos de borde irregular (islote difuso). Rodeando al islote hallamos el tejido exocrino

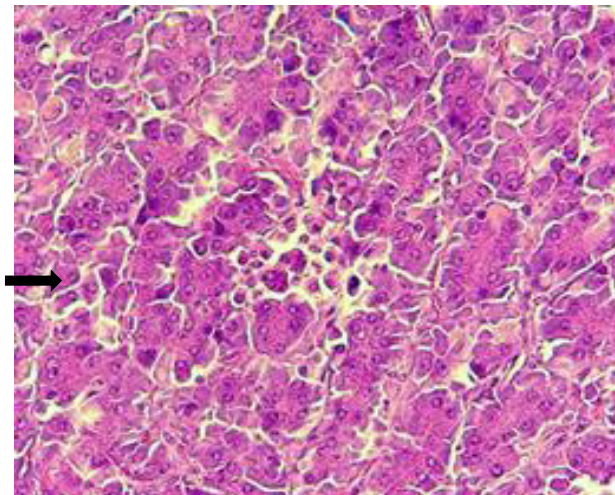


Figura 4.- Páncreas de alpaca (400X.). Tinción H-E se observa un islote pancreático, de contorno irregular, rodeado de tejido exocrino.

2. Técnica Inmunohistoquímica (IHQ)

2.1. Grupo control

Para nuestro grupo control, se utilizaron cortes histológicos de rata para evaluar y estandarizar el protocolo y los kit de inmunohistoquímica a emplear, determinando los tiempos en los diferentes pasos, verificando la calidad, eficiencia de los diversos insumos empleados. (Figura 5,6).

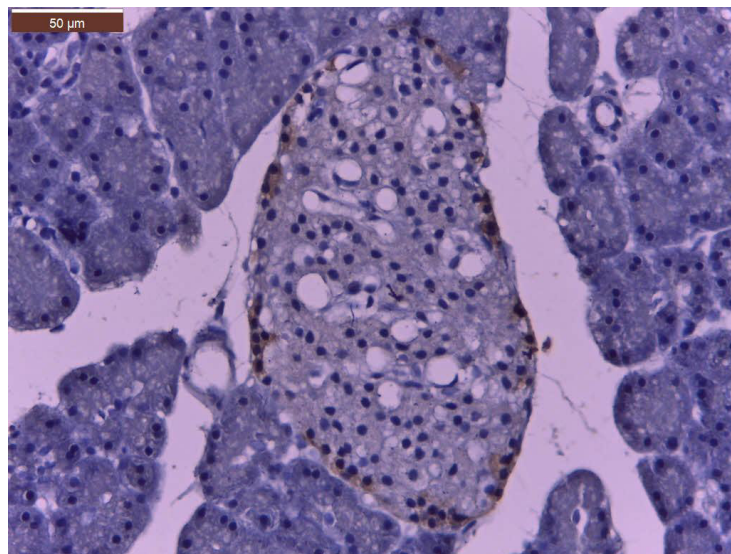


Figura 5.- Páncreas de rata (400x), técnica inmunohistoquímica, células con reacción positiva a glucagón en periferia del islote.

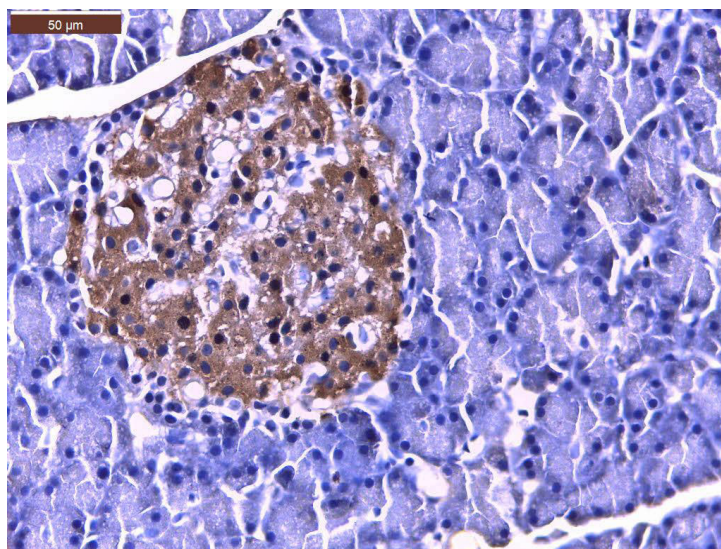


Figura 6.- Páncreas de rata (400x), técnica IHQ, se observa islote compacto, células reacción positiva a insulina.

2.2. Patrón de distribución de células beta y alfa

2.2.1. Identificación de células beta

Se observó a 100X, islotes pancreáticos con reacción positiva a insulina distribuidos aleatoriamente en todo el páncreas (Figura 7). El tamaño de los islotes varió considerablemente, de diez o menos células a más de un centenar de células. De acuerdo a su morfología de 60-80% del total de islotes observados en alpacas jóvenes eran difusos (Figura 8), los islotes compactos están en menor proporción, generalmente de forma circular u oval. En alpacas adultas predominan los islotes compactos.

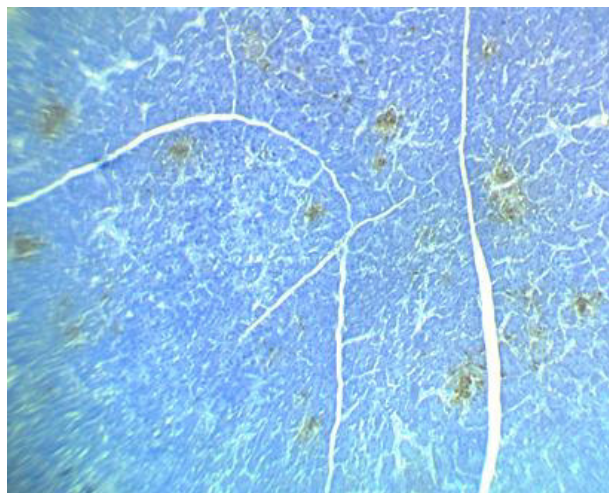


Figura 7.- Páncreas de alpaca joven (100X), IHQ, se observa distribución aleatoria de los islotes.

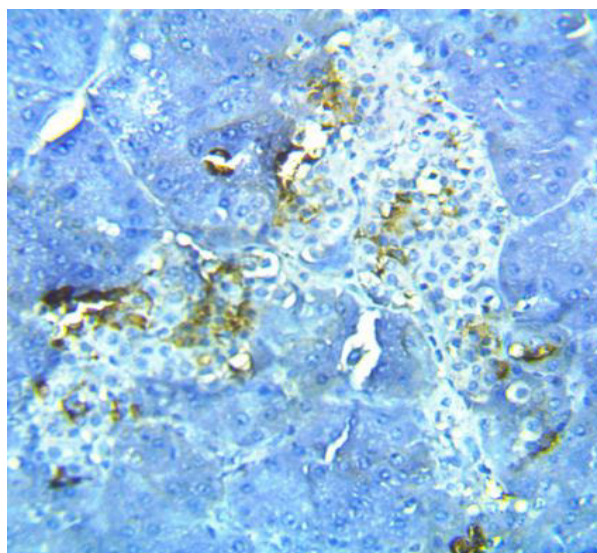


Figura 8.- Páncreas de alpaca joven, técnica IHQ (400X). Islote difuso de gran tamaño, conteniendo cientos de células., células positivo a insulina (<50%) formando grupos o dispersos.

El patrón de distribución de las células beta en el islote pancreático de alpaca es diverso. Es representativa la presencia de células beta en los islotes con distribución centrípeta, polar, aleatoria, periférica, en racimo y células beta aisladas en el perfil islotico. Sin embargo existe tendencia de éstas hacia el eje central del islote (Figuras 9-19)

Una característica constante durante la lectura de láminas fue la presencia de células beta individuales o solitarias distribuidas al azar en la porción exocrina del páncreas. Islotes con células negativas a insulina fueron escasos, constituyendo menos del 10% del total de perfiles islóticos evaluados. También se halló un islote en el tejido conectivo interlobular, con células

positivas a insulina. La marcación= 2 en células productoras de insulina es predominante en nuestro estudio.

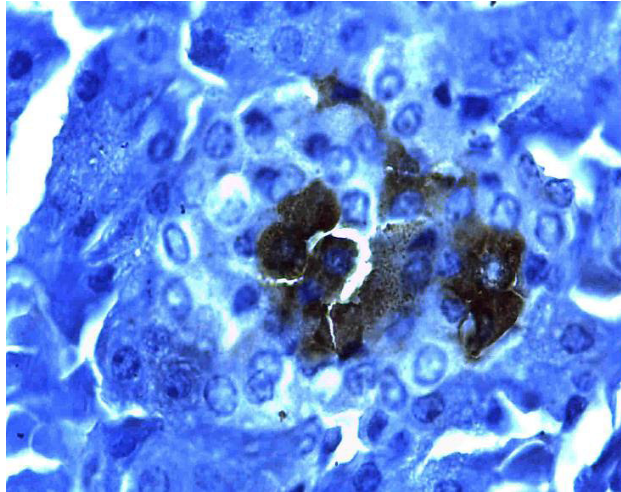


Foto 9.- Páncreas de alpaca adulta, técnica IHQ (400X) distribución centrípeta de las células beta, rodeado de otras células endocrinas Se observan gránulos de insulina. Marcación 2= fuerte.

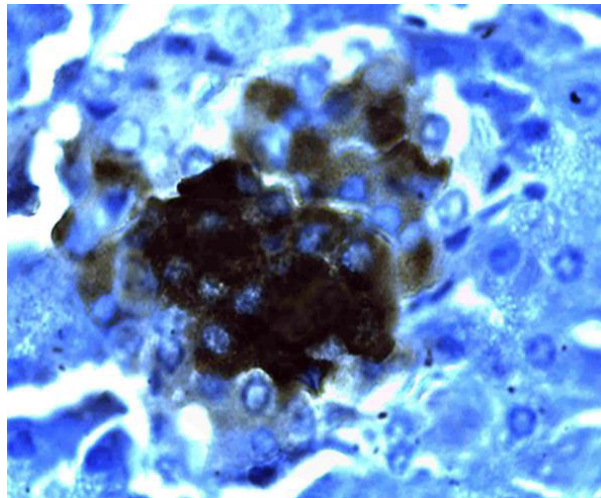


Figura 10.- Páncreas de alpaca adulta, técnica IHQ (400X), islote compacto con células beta de distribución central (>50%), rodeado de otros tipos celulares, marcación 2= fuerte

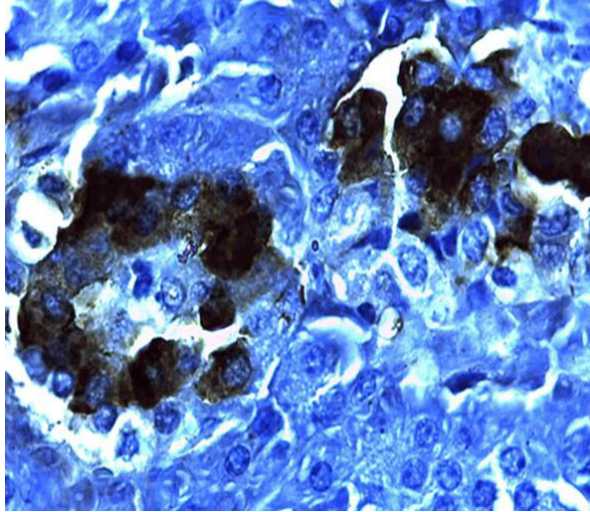


Figura 11.-Páncreas de alpaca adulta con IHQ (400X), mono capa de células beta rodeando células endocrinas no beta (derecha). Izquierda superior: células beta en el eje central del islote.

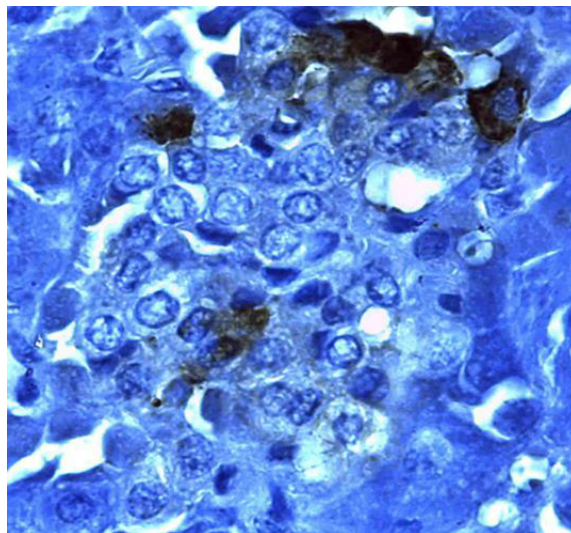


Figura 12.- Páncreas de alpaca adulta, técnica IHQ (400X), se observa células positivas a insulina en la periferia, región polar del islote y células hacia el centro, marcación 2= fuerte

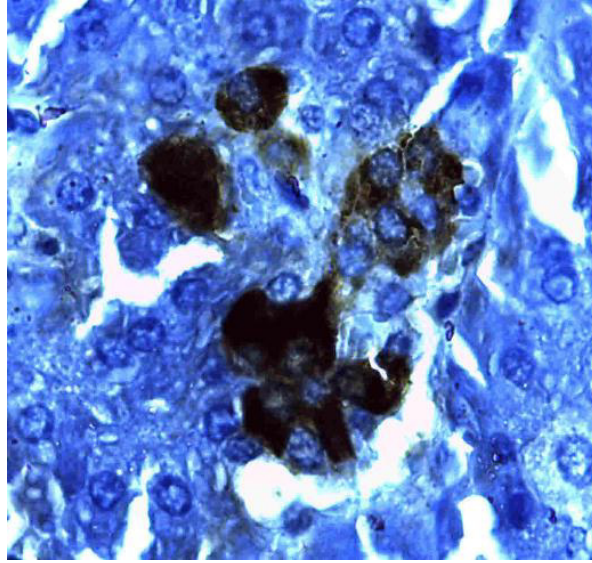


Figura 13.- Páncreas de alpaca adulta, técnica IHQ (400X), islote compacto, con células beta en racimo (clusters), marcación 2= fuerte.

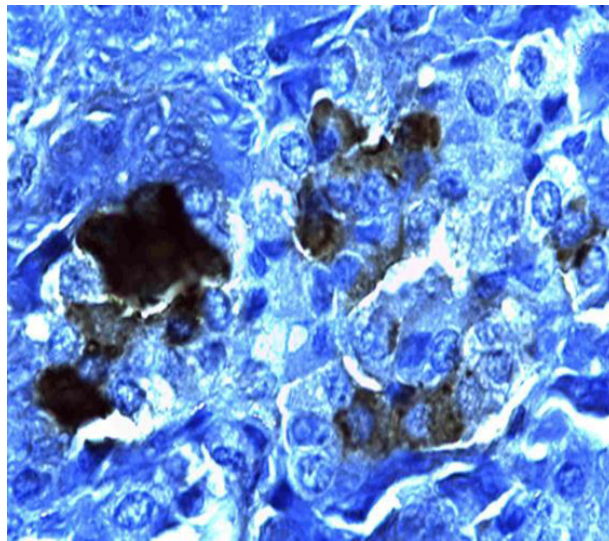


Figura 14.- Páncreas de alpaca joven, técnica IHQ (400X), con células beta en racimo y aisladas, en periferia, en centro y periferia del islote, marcación 2= fuerte.

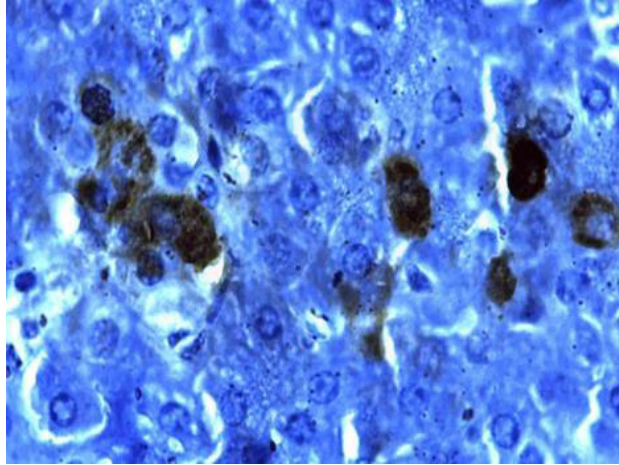


Figura 15.- Páncreas de alpaca joven, técnica IHQ (400X), distribución de células beta en uno de los polos del perfil islotico y células beta individuales en tejido exocrino, marcación 2= fuerte.

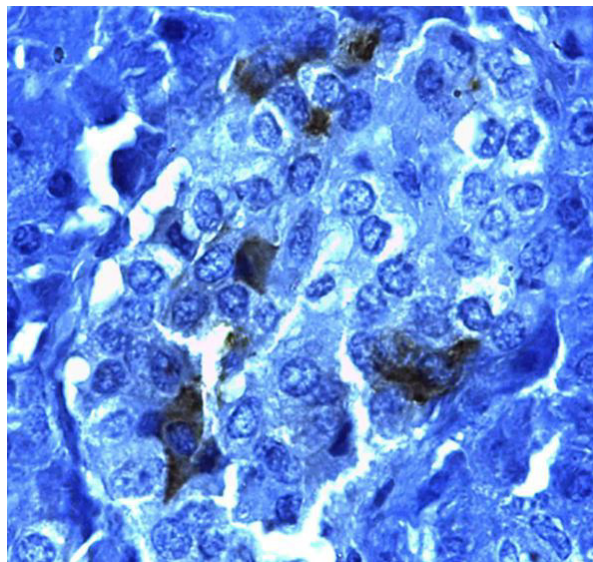


Figura 16.- Páncreas de alpaca adulta, técnica IHQ (400X), células solitarias positivas a insulina dispersas al azar en el islote pancreático, marcación 2= fuerte.

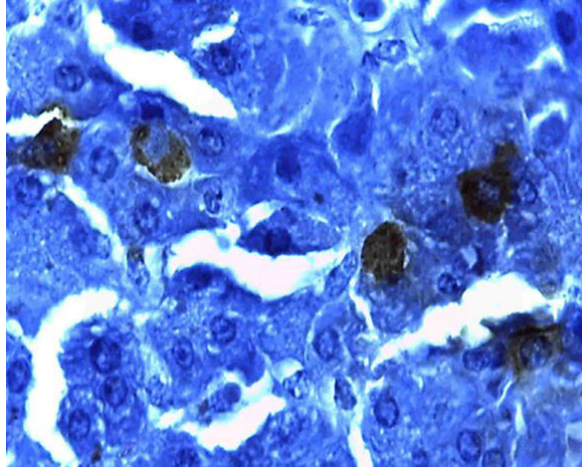


Figura 17.- Páncreas de alpaca adulta, técnica IHQ (400X), células solitarias positivas a insulina, entre células del parénquima exocrino, marcación= 2.

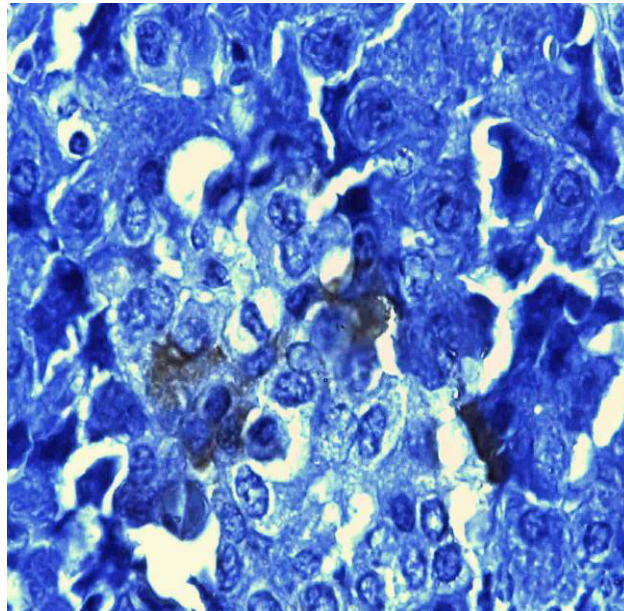


Figura 18.- Páncreas de alpaca joven, técnica IHQ (400X) islote con células solitarias, insulina positiva, marcación = 1 (débil).

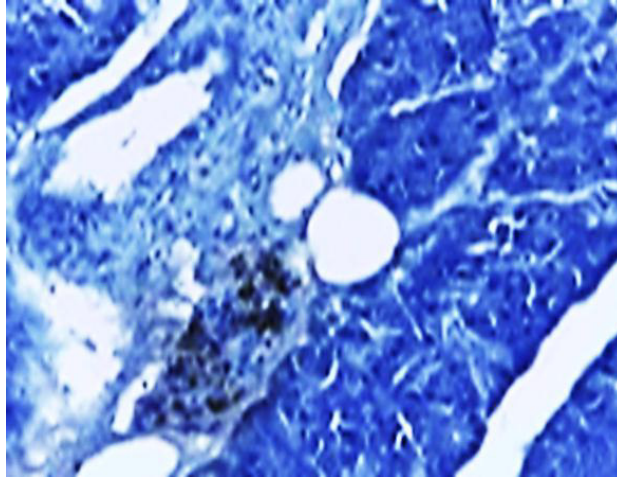


Figura 19.- Páncreas de alpaca joven, técnica IHQ (400X) con islote en tejido conectivo interlobulillar con células insulina positiva de distribución aleatoria, marcación= 2

2.2.2. Identificación de células alfa

Se aprecian células con reacción positiva a glucagón en islotes de las diferentes regiones del páncreas. Estas células pueden estar distribuidas aleatoriamente en el perfil islotico, otras individualmente o en grupos de dos, tres o más células, pero tienen mayor tendencia a la periferia. También se ubican células alfa individuales dispersas al azar en el tejido exocrino y a nivel de los ductos (Figura 20-35). Se evidenciaron islotes con marcación cero para glucagón. Las células productoras de glucagón presentaron predominantemente un grado de marcación = 1

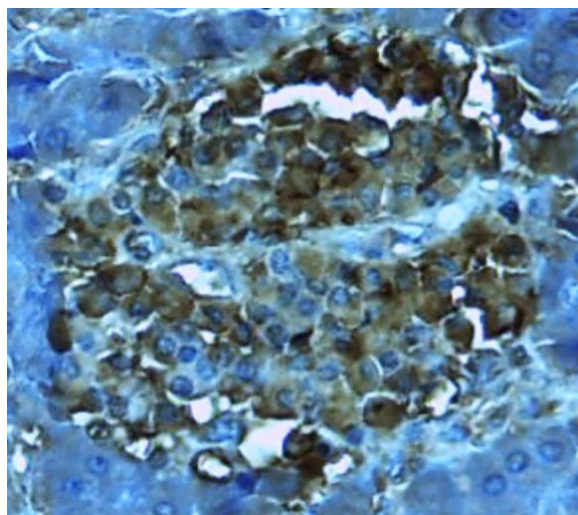


Figura 20.- Páncreas de alpaca joven, técnica IHQ (400X) islote mixto compacto con marcación =2 células positivas a glucagón, distribuidas en todo el islote, en la periferia y centro rodeando a otros tipos celulares que se hallan en menor proporción.

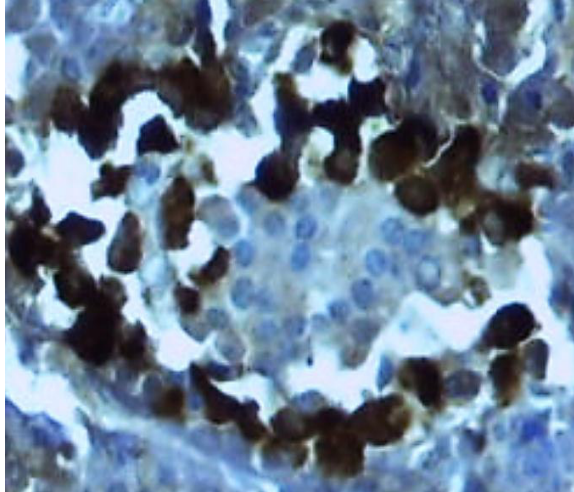


Figura 21.- Páncreas de alpaca adulta, técnica IHQ (400X), células alfa distribuidas en la periferia del islote rodeando a otras células endocrinas.

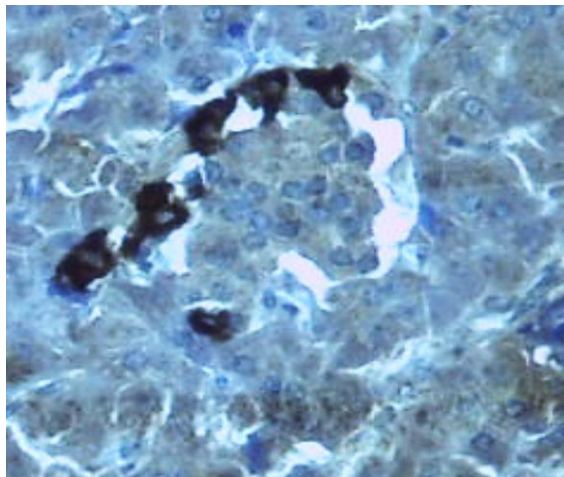


Figura 22.- Páncreas de alpaca adulta, técnica IHQ (400X), distribución periférica de células individuales con reacción positiva a glucagón en el perfil del islote pancreático.

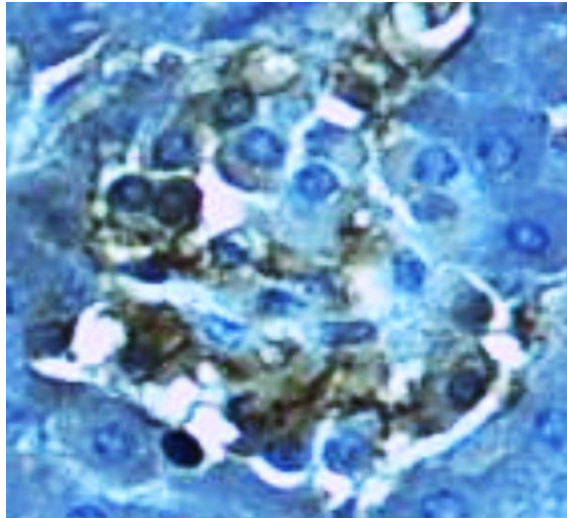


Figura 23.- Páncreas de alpaca joven, técnica inmunohistoquímica (400X), reacción positiva a glucagón en células de la periferia y algunas en el centro del islote.

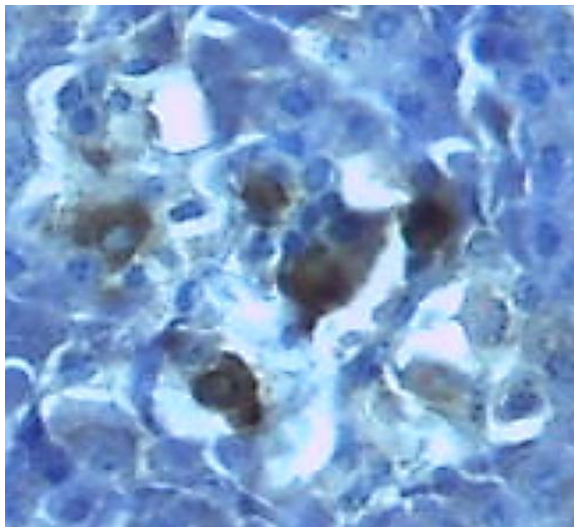


Figura 24.- Páncreas de alpaca joven, técnica IHQ (400X), islote difuso, distribución periférica de células glucagón positivos. Marcación= 1-2.

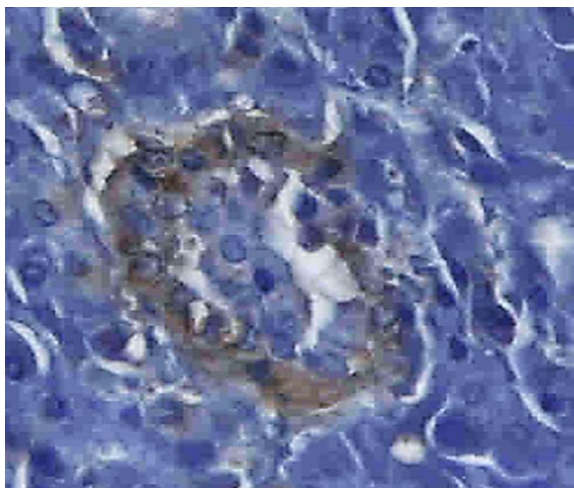


Figura 25.- Páncreas de alpaca adulta, técnica IHQ (400X), islote compacto con células alfa formando un cerco perimétrico continuo que rodea otros tipos celulares.

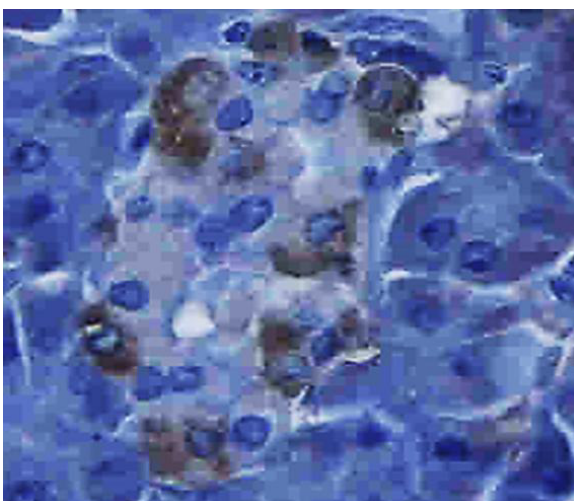


Figura 26.- Páncreas de alpaca adulta, técnica IHQ (400X), islote pancreático con células positivas a glucagón, de distribución periférica, marcación = 2.

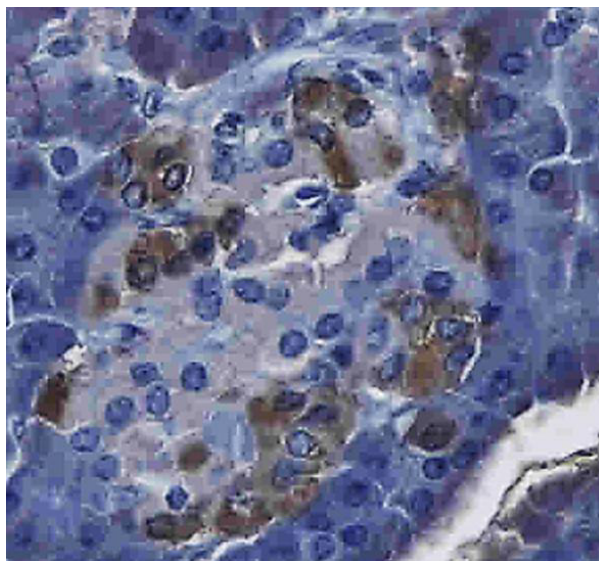


Figura 27.- Páncreas de alpaca adulta, técnica IHQ (400X) islote compacto con células alfa individual o agrupados de dos, tres o más en la periferia.

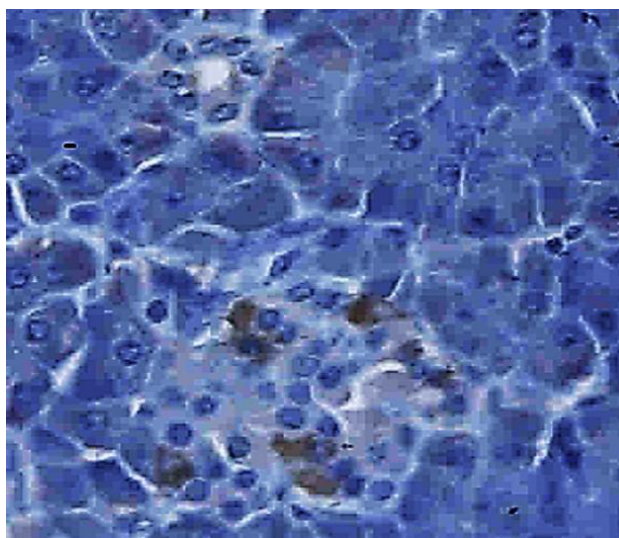


Figura 28.- Páncreas de alpaca, técnica IHQ (400X), islote con células positivas a glucagón, marcación = 2

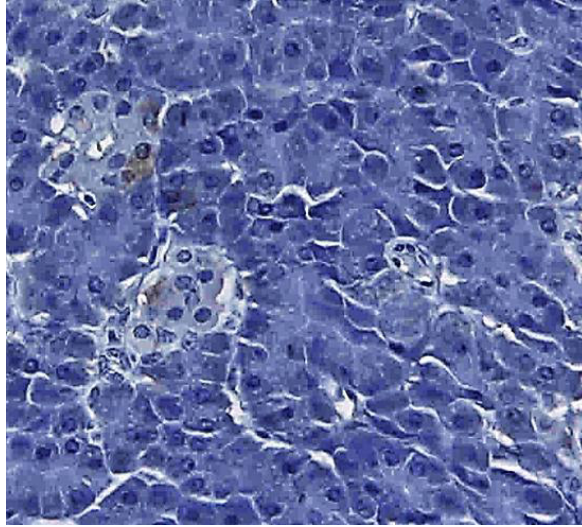


Figura 29.- Páncreas de alpaca joven, técnica IHQ (400X), reacción positiva débil a glucagón en células adyacente al conducto.

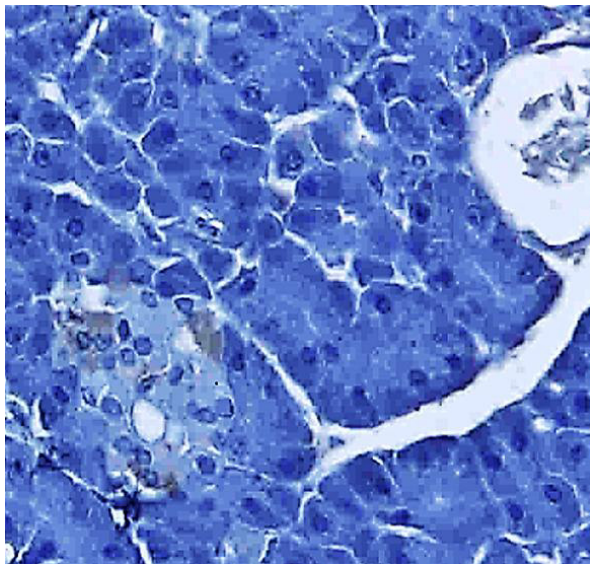


Figura 30.- Páncreas de alpaca adulta, técnica inmunohistoquímica (400X), reacción positiva débil a glucagón en células de islote adyacente a conducto.

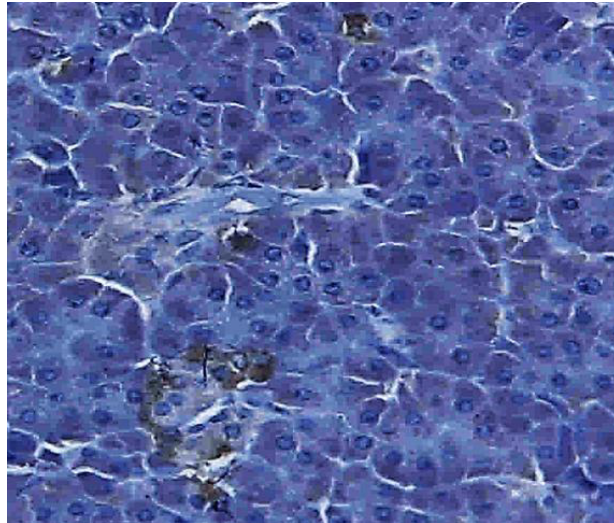


Figura 31.- Páncreas de alpaca joven, técnica inmunohistoquímica (400X) reacción positiva a glucagón en células individuales del páncreas exocrino.

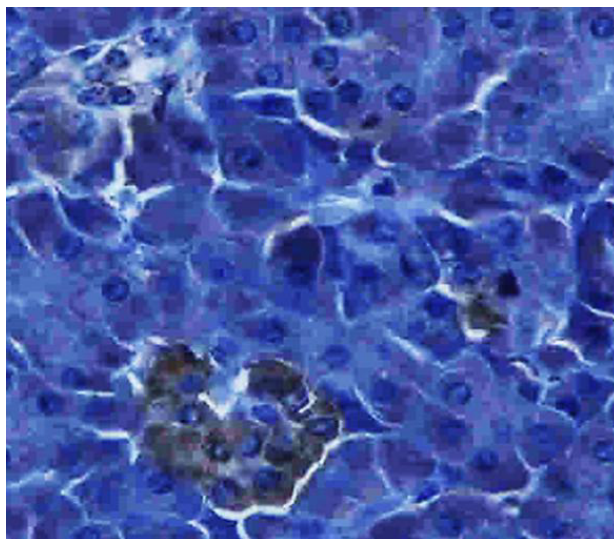


Figura 32.- Páncreas de alpaca adulta, técnica inmunohistoquímica (400X) islote compacto con células positivas a glucagón y célula solitaria entre células de los acinos (medio lateral izquierdo).

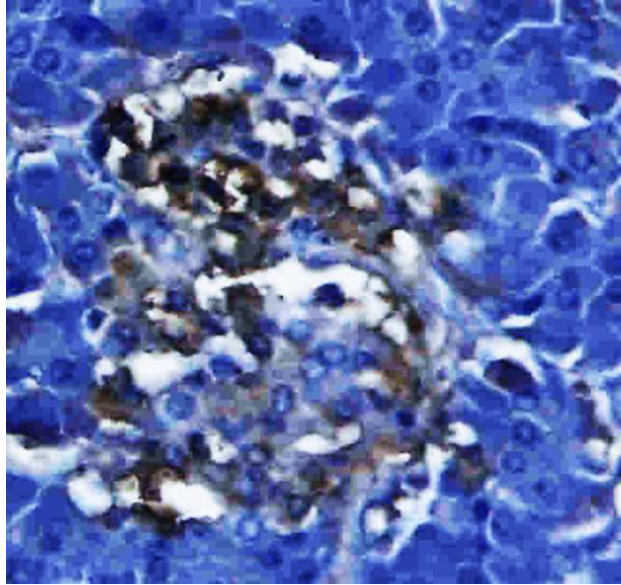


Figura 33.- Páncreas de alpaca joven, técnica inmunohistoquímica < 2 años (400X), islote mixto con distribución aleatoria del componente alfa.

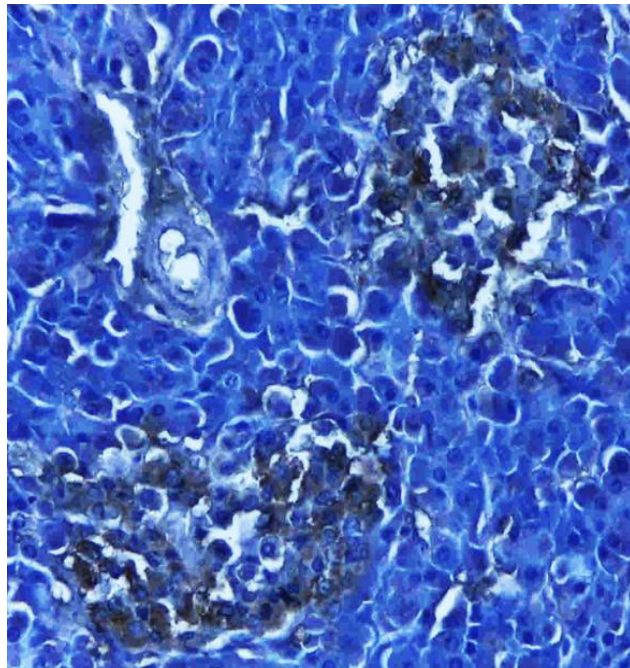


Figura 34.- Páncreas de alpaca joven, técnica inmunohistoquímica (400X,), islote mixto con distribución aleatoria de su componente celular positivo a glucagón. Marcación = 2.

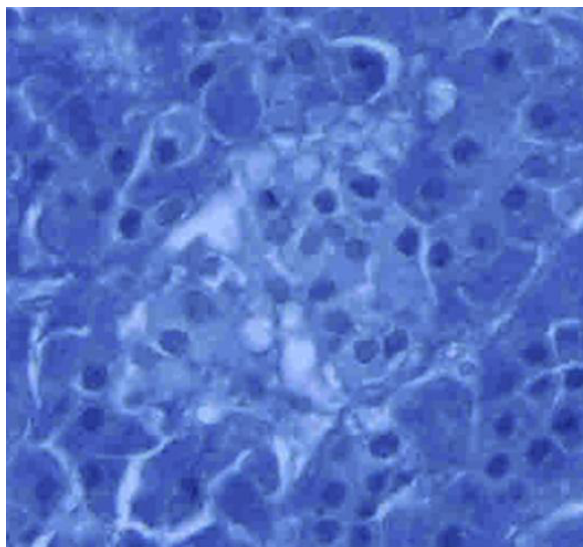


Figura 35.- Páncreas de alpaca, técnica inmunohistoquímica (400X), islote con marcación = 0 para glucagón.

2.3. Conteo de Islotes, células beta y células alfa en páncreas de alpacas

2.3.1 Promedio de islotes en páncreas de alpaca

Se observó distribución aleatoria en todo el páncreas (Cuadro 3).

Cuadro 3.- Número de islotes por campo (100X) por subregiones en páncreas de alpacas. Promedio, (desvío estándar).

Edad	Lóbulo Izquierdo			Lóbulo Derecho			Cuerpo	
	Base	Medio	Extremo	Base	Medio	Extremo	Base	Extremo
Jóvenes	5.52 (3.12)	5.78 (3.5)	6.46 (2.65)	4.94 (2.73)	7.06 (2.88)	5.14 (2.48)	4.22 (2.36)	4.92 (2.52)
Adultas	5.73 (2.65)	3.74 (2.52)	5.19 (2.84)	6 (3.2)	4.38 (2.3)	4.74 (2.82)	5 (2.82)	4.23 (2.06)

Representación de los islotes de Langerhans por regiones en páncreas de alpacas adultas (Cuadro 4).

Cuadro 4.-Número de islotes por campo (100X) por regiones de páncreas en alpacas. Promedio (desvío estándar).

Edad	Lóbulo izquierdo	Lóbulo derecho	Cuerpo
Jóvenes	5.92(3.11)	5.71(2.85)	4.57(2.45)
Adultas	4.85(2.79)	4.89(2.75)	4.57(2.43)

2.3.2. Porcentaje de células beta en islotes pancreáticos de alpaca

Se encontró células beta en todas las subregiones del páncreas. En jóvenes el 8% de los islotes observados en extremo del cuerpo y base del lóbulo derecho presentaron reacción negativa a insulina. En adultas el 4% de los islotes observados del lóbulo izquierdo y 8% de la base del cuerpo fueron negativos a insulina. (Cuadro 5).

Cuadro 5.- Células beta por sub-regiones en perfiles de islotes en páncreas de alpaca (400X). Porcentaje (desviación estándar)

Edad	Lóbulo Izquierdo			Lóbulo Derecho			Cuerpo	
	Base	Medio	Extremo	Base	Medio	Extremo	Base	Extremo
Jóvenes	41.91 (16.59)	47.93 (14.81)	46.35 (16.68)	32.91 (16.21)	46.88 (12.42)	38.78 (18.93)	40.95 (16.89)	37.12 (18.98)
Adultas	45.98 (14.57)	63.89 (20.57)	53.51 (21.81)	73.00 (16.77)	40.42 (21.45)	45.51 (19.68)	58.02 (26.77)	46.65 (17.55)

La comparación por regiones en páncreas de alpacas jóvenes y adultas, evidencia un aumento en la proporción relativa de células productoras de insulina (Cuadro 6).

Cuadro 6.-Porcentaje de células beta por regiones en perfiles de islotes de páncreas de alpaca (400X). Promedio (desvío estándar)

Edad	Lóbulo izquierdo	Lóbulo derecho	Cuerpo
Jóvenes	44.99(16.12)	39.39(16.99)	38.99(17.92)
Adultas	54.46(20.31)	52.98(23.91)	52.33(23.07)

2.3.3. Número de células beta solitarias en tejido exocrino

La presencia de células individuales en la porción exocrina del páncreas, fue un hallazgo constante de todas las muestras histológicas en páncreas de alpaca jóvenes y adultas; observando un mayor número de células individuales por campo (100X) en alpacas adultas. En alpacas adultas se observó un mayor número de células en la base del cuerpo y lóbulo izquierdo, en comparación de sus otras porciones. (Cuadro 7).

Cuadro 7.- Número de células beta solitarias por campo (100X) en subregiones de páncreas exocrino de alpacas. Promedio, desvío estándar.

Edad	Lóbulo Izquierdo			Lóbulo Derecho			Cuerpo	
	Base	Medio	Extremo	Base	Medio	Extremo	Base	Extremo
Jóvenes	9.69 (4.79)	6.17 (4.48)	8.96 (7.21)	7.68 (6.37)	13.30 (7.54)	6.32 (4.43)	8.18 (3.54)	10.48 (6.21)
Adultas	10.79 (6.35)	3.57 (2.62)	5 (3.36)	8.82 (5.13)	5.21 (2.91)	7.77 (5.41)	13.79 (6.69)	8.18 (7.11)

El promedio relativo de células solitarias en alpacas jóvenes presentaron incremento en lóbulo izquierdo. La alpaca adulta presentó mayor número de células individuales en el parénquima exocrino, comparado con alpacas jóvenes (Cuadro 8).

Cuadro 8.- Promedio de células beta solitarias por campo (100X) en regiones de páncreas exocrino de alpacas

Edad	Lóbulo izquierdo	Lóbulo derecho	Cuerpo
Jóvenes	8.69(6.15)	8.52(6.64)	9.55(5.36)
Adultas	6.41(5.18)	7.11(4.73)	10.05(7.39)

2.3.4. Porcentaje de células alfa en perfiles de islotes en páncreas de alpacas

Las células alfa constituyen un grupo poblacional importante del islote. Se observó presencia de células alfa en islotes de todas las regiones del páncreas en los dos grupos etarios en estudio. También se observó células aisladas o individuales fuera de los islotes, disperso al azar.

La distribución de las células alfa en las diferentes subregiones presenta marcadas diferencias. Se observó una proporción relativa baja en base de lóbulo izquierdo, subregión media del lóbulo derecho y extremo del cuerpo en páncreas de alpacas adultas. (Cuadro 9).

Cuadro 9.- Porcentaje de células alfa por subregiones en perfiles de islotes de páncreas en alpacas (400X)

Edad	Lóbulo Izquierdo			Lóbulo Derecho			Cuerpo	
	Base	Medio	Extremo	Base	Medio	Extremo	Base	Extremo
Jóvenes	40.47 (11.50)	41.77 (13.18)	42.99 (16.37)	45.46 (15.93)	48.89 (11.59)	42.42 (16.99)	41.68 (13.48)	53.47 (17.08)
Adultas	38.83 (9.51)	49.5 (17.81)	40.08 (14.81)	47.92 (20.63)	37.19 (17.74)	42.72 (8.63)	43.36 (15.7)	31.22 (19.48)

Se observó diferencias regionales en el porcentaje de células alfa en los islotes pancreáticos de alpacas. En alpacas jóvenes se observó una mayor proporción de células alfa a nivel del cuerpo, mientras que en alpacas adultas presentaron mayor porcentaje de células alfa en lóbulo izquierdo y un bajo porcentaje a nivel del lóbulo derecho (cuadro 10).

Cuadro 10.- Porcentaje de células alfa por regiones en perfiles de islotes de páncreas en alpaca (400X) (%)

Edad	Lóbulo izquierdo	Lóbulo derecho	Cuerpo
Jóvenes	42.03 (13.84)	45.43 (15.18)	47.87 (16.92)
Adultas	35.13 (12.60)	28.50 (14.91)	24.39 (13.64)

2.3.5. Porcentajes de células beta y alfa en Páncreas de alpacas

Los valores en las proporciones de células alfa y beta en alpacas jóvenes se aproximan, mientras que en adultas estos valores se distancian con deprecio de las células alfa. La célula beta fue el principal grupo poblacional observado en alpacas adultas, siendo las células alfa el segundo tipo celular que lo constituye (Cuadro 11).

Cuadro 11.- Comparativo entre las poblaciones alfa y beta en perfiles de islotes en alpacas (400X) (%) Promedio (desvío estándar)

Tipo celular	Jóvenes	Adultas
Beta	41.76 (17.06)	54.46 (22.29)
Alfa	44.47(15.21)	35.13 (14.35)

La distribución de los islotes es aleatoria en páncreas de alpacas jóvenes y adultas. Sus formas, tamaños y composición de sus tipos celulares son variables. Los islotes difusos son característicos de alpacas jóvenes y se observan más islotes compactos en alpacas adultas.

En los dos grupos en estudio no se puede apreciar diferencias en relación al número de islotes por regiones del órgano, es decir, lóbulos derecho e izquierdo y cuerpo, sin embargo, esto si puede verse si lo analizamos por subregiones, es decir, base, medio y extremo. Lo cual es similar a lo que ha sido reportado en roedores, donde se sugiere un mayor número de islotes en la cola en comparación a la cabeza (Elayat *et al.*, 1995) pero difiriendo con otros autores que hicieron trabajos en ratones donde la distribución fue homogénea en todo el órgano (Kim *et al.*, 2009).

La variación en el tamaño de los perfiles islóticos observados en alpacas es un hallazgo similar a lo reportado en diversas especies como roedores (Elayat *et al.*, 1995); equinos (Helmstaeder *et al.*, 1976; Furuoka *et al.*, 1989) bovinos (Bonner-Weir, 1980; Hiratkusa *et al.*, 1996); camellos (Adaghate, 1997) y humanos (Cabrera *et al.*, 2016). La razón de esta variación, podría ser explicada por adaptaciones, evolución, en respuesta a estímulos metabólicos y como resultado del desarrollo embriológico (Adaghate, 1997).

La distribución de células beta y alfa es diversa, ambos tipos celulares pueden hallarse entremezclados en la mayoría de islotes observados. En los islotes restantes se apreció una mayor tendencia de estas células hacia el eje central del perfil islótico. Por otro lado, las células alfa pueden estar presentes en cualquier parte del perfil islótico, pero con mayor tendencia hacia la periferia. Lo cual difiere de los hallazgos reportados en el caballo, donde el centro del islote pancreático es predominantemente ocupado por células alfa, rodeado por un manto de células beta. Pero si es similar a la distribución en bovinos, donde las células beta se ubican en todo el islote. En el camello, las células beta se distribuyeron en todo el islote en el centro y la periferia, también se encontraron fuera de los márgenes del islote entre los acinos y el tejido conectivo interlobulillar, las células alfa eran en su mayoría observados como grumos en la periferia (Hafez *et al.*, 2015).

Los datos morfológicos obtenidos en el presente estudio como son la presencia de células solitarias beta y alfa fuera del islote, entre los acinos y a nivel de los ductos sugerirían capacidad de neogénesis del páncreas en la alpaca. Estudios sugieren la activación de

mecanismos de regeneración de la porción endocrina (Steiner *et al.*, 2010); la neogénesis se refiere a la formación de nuevas células beta a partir de precursores no endocrinos; el proceso requiere la proliferación de estos precursores y una posterior diferenciación de éstos hacia células beta funcionales. La naturaleza de estos precursores no ha sido determinada con claridad, pero diferentes estudios sugieren que se encontrarían en el ducto pancreático y serían de origen epitelial (Barberá y Gasa, 2007). Aunque Lipsett y Finegood, 2002 sugieren que las áreas focales neogénicas en ratas con infusión de glucosa no surgen de la replicación y diferenciación de células progenitoras ductales y que por el contrario, la transdiferenciación de células acinares en células beta y la desdiferenciación de las células acinares en áreas focales neogénicas conducen a la formación de nuevas células β durante la hiperglucemia prolongada.

El presente estudio indica poca diferencia entre la proporción de los componentes beta (54.34%) y alfa (42.75%) en islotes pancreáticos de alpacas jóvenes y adultas, siendo los otros tipos celulares el porcentaje restante. Datos similares se han descrito en islotes humanos (Cabrera *et al.*, 2006; Brissova *et al.*, 2005). Pero difiere de los reportes en ratas sanas donde las proporciones de los componentes son mayores, beta (80%) y alfa (20%) (Elayat *et al.*, 1995; Cabrera *et al.*, 2006).

Se observó un incremento en el componente celular beta entre animales jóvenes (50.70%) a adultos (54.34%) Un estudio realizado en alpacas neonatas hasta los 45 días de edad, indican aumento de este tipo celular con la edad (Rodríguez *et al.*, 2015).

Hay una variación en la presentación de células alfa en los dos grupos etarios, lo que podría sugerir activación de los mecanismos de regeneración en el páncreas. Merino, 2015 en estudios en ratas obesas también describe un grado de plasticidad del páncreas para este tipo celular relacionado a su estado fisiológico, como ocurriría en eventos fisiológicos y patológicos como la diabetes tipo 2 (Barberá y Gasa, 2007).

Los cambios en la presencia de células beta y alfa en las distintas edades en la alpaca, estarían relacionados a los mecanismos de adaptación y necesidades metabólicas presentes en el páncreas de alpacas a distintas edades. Estos mecanismos que usa el páncreas están reportados en estudio realizados en ratas, ratones, perros y humanos. Mecanismos que usa el organismo para mantener la homeostasis de la glucemia (Barberá y Gasa, 2007).

V. CONCLUSIONES

- Usando la técnica de inmunohistoquímica se observó células beta y células alfa en islotes de todas las regiones del páncreas de alpacas jóvenes y adultas; así como células beta y alfa aisladas, fuera de los límites del islote, entre los acinos y a nivel de los ductos.
- La distribución de las células beta fue mayoritariamente aleatoria en islotes pancreáticos de alpacas jóvenes, mientras que en alpacas adultas se observó una mayor tendencia de las células beta al eje central y una distribución periférica de las células alfa.
- Las células beta y alfa constituyen en número, los dos tipos celulares más importantes de los islotes pancreáticos de alpacas jóvenes y adultas.

VI. LITERATURA CITADA

1. **Adegate E. 1997.** Immunohistochemical Identification of pancreatic hormones, neuropeptides and cytoskeletal proteins in páncreas of the camel (camelus dromedarius). *J Morphol*, 231: 185-193.
2. **Barberá A, Gasa R. 2007.** Desarrollo embrionaria del páncreas y regeneración en el páncreas adulto. En: *El Islote Pancreático en el Desarrollo y Tratamiento de la Diabetes*. Sociedad Española de Diabetes, 5 (8). P 125-136.
2. **Bonner-Weir S, Like AA, 1980.** A dual population of islets of Langerhans in bovine pancreas. *Cell and Tissue Research*, 206(1), pp.157–170.
3. **Brissova M, Fowler M, Nicholson W, Chu A, Hirshberg B, Harlan D, Powers A. 2005.** Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy. *J Histochem Cytochem* 53: 1087-97.
4. **Busnardo, A. C., DiDio, L. J., Tidrick, R. T., & Thomford, N. R., 1983.** History of the pancreas. *The American journal of surgery*, 146(5), 539-550.
5. **Cabrera O, Berman D, Kenyan N. 2006.** The unique cytoarchitecture of human pancreatic is lets has implications for islet cell function. *Proc Natl Acad Sci USA*103:2334- 2339.
6. **Camacho A, 2015.** Modelos de cirugía bariátrica en rata Wistar normopesa y no diabética. Cambios histológicos a nivel pancreático y en la homeostasis de la glucosa. Tesis para optar el grado de doctor, Departamento de Anatomía y embriología Humanas Universidad de Cádiz. Colombia.
7. **Cebra C, McKane S, Tornquist S. 2001a.** Effects of exogenous insulin on glucose tolerance in alpacas. *Am J Vet Res* 62: 1544-1547. [[Links](#)]
8. **Cebra C, Tornquis S, Van Saun R, Smith B. 2001b.** Glucose tolerance testing in llamas and alpacas. *Am J Vet Res* 62: 682-686. doi: 10.2460/ ajvr.2001.62.682 [[Links](#)]

9. **Cebra, C.K., Bildfell, R.J. & Fischer, K.A., 2006.** Microanatomic features of pancreatic islets and immunolocalization of glucose transporters in tissues of llamas and alpacas. *American Journal of Veterinary Research*, 67(3), pp.524–528.
10. **Cleaver, O. and Y. Dor, 2012.** Vascular instruction of pancreas development. *Development*, 139(16): p. 2833-43.
11. **Climent S, Sarasa M, Muniesa P, Latorre R. 2005.** Manual de Anatomía y embriología de los animales domésticos- Conceptos básicos y datos aplicativos. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España. Pp. 243-264.
12. **Cryer, P.E. Minireview, 2002.** Glucagon in the pathogenesis of hypoglycemia and hyperglycemia in diabetes. *Endocrinology* 153, 1039-48.
13. **Chávez R, A., Panesi C, G., Sato S, A., Santos R, F., Navarrete Z, M, 2015.** Anatomía macroscópica del páncreas de la alpaca adulta (*Vicugna pacos*). Libro Virtual VII Congreso Mundial de Camélidos Sudamericanos Puno - Perú, pp. 153-156.
14. **Deconink J, Potvliege P, Gepts W. 1971.** The ultrastructure of the human pancreatic islets I. The islets of adults. *Diabetologia* 7: 266-82 4.
15. **De Sharp, P. and J.S. Villano 2013.** Important biological features, in the laboratory rat. Taylor & Francis Group: Boca Raton, PL. p. 9-11,19.
16. **Dunning, B.E. & Gerich, J.E. 2007.** The role of alpha-cell dysregulation in fasting and postprandial hyperglycemia in type 2 diabetes and therapeutic implications. *Endocr Rev* 28, 253-83.
17. **Elayat A, El-Naggar M, Mohammad T. 1995.** An immunocytochemical and morphometric study of the rat pancreatic islets. *J. Anat.* 186:629-637.
18. **Fowler M, Zinkl J. 1989.** Reference ranges for hematologic and serum biochemical values in llamas. *Am J Vet Res* 50 (12): 2049–2053.
19. **Furuoka H, Ito H, Hamada M, Suwa T, Satoh H, Itakura C. 1989.** Immunocytochemical component of endocrine cells in pancreatic islets of horses. *Jpn J Vet Sci.* 51:35–43.
20. **Ghezzi MD, Alzola RH, Lupidio MC, Massone A, Castro N, Rodriguez JA. 2000.** Conducto hepatopancreático de la Llama (*Lama glama*). *Revista chilena de anatomía*, 18(1), pp.27–34.
http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-98682000000100004&lng=en&nrm=iso&tlng=en [Accessed May 30, 2016].
21. **Hafez S, Zaghloul D, Caceci T. 2015.** Immunohistochemical identification of the endocrine cells in the pancreatic islets of the camel, horse and cattle. *Eur. J. Anat.* 19(1): 27-35.

22. **Helmstaedter V, Feurle GE, Forssmann WG, 1976.** Insulin, glucagon and somatostatin-immunoreactive endocrine cells in the equine pancreas. *Cell Tiss Res.* ;172:447–54.
23. **Hiratsuka T, Abe M, Takehana K, Iwasa K, Hiraga T, Kobayashi A. 1996.** Immunohistochemical analysis of the endocrine cells in the pancreatic islets of cattle. *Okajimas Folia Anat Jpn.* 72 :285–95.
24. **Kaneko J. 1989.** *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, Fourth ed. Academic Press, San Diego 932 p.
25. **Karam, J.H., 1996** Reversible insulin resistance in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Horm Metab Res*, 1996. 28(9): p. 440-4.
26. **Kimmel J, Pollock H, Hazelwood R. 1971.** A new pancreatic polypeptide. *Fed Proc (USA)* 30: 1318.
27. **Kim SK, Mac Donald RJ. 2002.** Signaling and transcriptional control of pancreatic organogenesis. *Current opinion in genetics & development*, 12 (5), 540-547.
28. **Kim, J.W. 2008.** Loss of beta-cells with fibrotic islet destruction in type 2 diabetes mellitus. *Front Biosci.*, 13: p. 6022-33.
29. **Klimstra D, Hruban R, Pitman M. 2007.** In: *Histology for Pathologists*, 3rd ed. Stacey E Mills, editor. Lippincott, Williams & Wilkins.
30. **Lane M. 1907.** The cytological characteristics of the areas of Langerhans. *Am J. Anat* 409-422.
31. **Lassen E, Pearson E, Long P, Schmotzer W, Kaneps A, Riebold T, 1986.** Clinical biochemical values of llamas: reference values. *Am. J. Vet. Res.* 47 (10), 2278–2280.
32. **Lifson, N., Lassa, C.V. & Dixit, P.K. 1985** Relation between blood flow and morphology in islet organ of rat pancreas. *Am J Physiol* 249, E43-8.
33. **Lipsett and Finegood DT. 2002.** β -Cell Neogenesis During Prolonged Hyperglycemia in Rats. *Diabetes Jun* 51(6): 1834-1841. <http://dx.doi.org/10.2337/diabetes.51.6.1834>
34. **Longuet, C. 2008.** The glucagon receptor is required for the adaptive metabolic response to fasting. *Cell Metab.*, 8(5):359-71. 2008. DOI: 10.1016/j.cmet.2008.09.008.
35. **Málaga J. 1976.** Descripción Anatomohistológica del Páncreas de Alpaca. Tesis para optar el Título de Médico Veterinario - UNTA. Puno-Peru.
36. **Meier J, Butler A, Saisho Y, Monchamp T, Galasso R, Bhushan A, Rizza R, Butler P. 2008.** Beta cell replication is the primary mechanism subserving the postnatal expansion of beta cell mass in humans. *Diabetes* 57: 1584-94.
37. **Merino B, 2015.** Adaptaciones Estructurales y Funcionales de la Célula Alfa Pancreática en un Modelo de Obesidad Inducida por Dieta Rica en Grasa. Tesis para optar el grado de

Doctor, Departamento de Biología Aplicada Instituto de Bioingeniería. Universidad Miguel Hernández. Elche-España.

38. **Nadal, A., Quesada, I. & Soria, B. 1999.** Homologous and heterologous asynchronicity between identified alpha-, beta- and delta-cells within intact islets of Langerhans in the mouse. *J Physiol* 517 (Pt 1), 85-93
39. **Noguchi, H. 2010.** Pancreatic stem/progenitor cells for the treatment of diabetes. *Rev Diabet Stud.*, 7(2): p. 105-11.
40. **Pagliuca, F.W. and D.A. Melton, 2013.** How to make a functional beta-cell. *Development*, 140(12): p. 2472-83.
41. **Panesi G, 2016.** Estudio Morfológico del páncreas en Alpacas (*Vicugna pacos*) Jóvenes y adultas. Tesis para optar el título de Médico Veterinario, Facultad de Medicina Veterinaria - UNMSM. Lima- Perú.
42. **Papaccio G, 1993.** Insulitis and islet microvasculature in type 1 diabetes. *Histol Histopathol* 8, 751-9.
43. **Quesada, I., Tuduri, E., Ripoll, C. & Nadal, A. 2008.** Physiology of the pancreatic alpha-cell and glucagon secretion: role in glucose homeostasis and diabetes. *J Endocrinol* 199, 5-19).
44. **Rodríguez J, Espinoza J, Rojas G, Lira B, Vásquez M, López-Torres B, Caro C. 2015.** Desarrollo de los Islotes de Langerhans en páncreas de crías de alpaca. *Rev Inv Vet Perú* 26(3): 381-388.
45. **Roche M, 2007.** Glucolipototoxicidad en la Célula Beta y su relación con la Diabetes Tipo 2. En: *El Islote Pancreático en el Desarrollo y Tratamiento de la Diabetes*. Sociedad Española de Diabetes, 5 (3). p. 50-65.
46. **Rossi, J., Santamaki, P., Airaksinen, M.S. & Herzig, K.H. 2005.** Parasympathetic innervation and function of endocrine pancreas requires the glial cell line-derived factor family receptor alpha2 (GFRalpha2). *Diabetes* 54, 1324-30.
47. **Slavin, B.G., Ong, J.M. & Kern, P.A. 1994.** Hormonal regulation of hormonesensitive lipase activity and mRNA levels in isolated rat adipocytes. *J Lipid Res* 35, 1535-41
48. **Steiner DJ, Kim A, Miller K, Hara M. 2010.** Pancreatic islet plasticity: Interspecies comparison of islet architecture and composition, *Islets*, 2:3, 135-145, DOI: 10.4161/isl.2.3.11815.
49. **Taborsky, G.J., Jr., 2010.** The physiology of glucagon. *J Diabetes Sci Technol.*, 4(6): p. 1338-44.
50. **Taniyama H, K Hirayama, Y Kagawa, T Kurosawa, M Tajima, T Yoshino, H Furuoka. 1999.** Histopathological and Immunohistochemical analysis of the endocrine and

- exocrine pancreas in twelve cattle with Insulin-Dependent Diabetes Mellitus (IDDM). J Vet Med Sci 61, 803-810.
51. **Unger, R.H. & Orci, L. 2010** Paracrinology of islets and the paracrinopathy of diabetes. Proc Natl Acad Sci U S A 107, 16009-12
 52. **Unger, R.H. & Cherrington, A.D. 2012.** Glucagonocentric restructuring of diabetes: a pathophysiologic and therapeutic makeover. J Clin Invest 122, 4-12
 53. **Vladimír K. 2002** Synopsis of the Organ Anatomy, in The Laboratory Rat G.J. Krinke, Editor. 2000, Elsevier. p. 283-319.
 54. **Wierup N, Svensson H, Mulder H, Sundler F., 2002** The ghrelin cell: a novel developmentally regulated islet cell in the human pancreas. Regul Pept, 107(1-3): p. 63-9.
 55. **Xu RJ, Wang T, Zhang SH. 1999.** Functional structure and growth of the pancreas in postnatal growing animals: a review. Developments in Animal and Veterinary Sciences (Netherlands).
 56. **Zanuzzi C. 2010.** Efectos de la intoxicación con *Solanum glaucophyllum* (duraznillo blanco) sobre la proliferación, diferenciación y muerte celular en el intestino de conejos. Tesis de Doctorado. Argentina: Univ Nacional de La Plata. 286 p.

VII. ANEXO

ANEXO 1. PROTOCOLO DE INMUNOHISTOQUIMICA ABC

DESPARAFINADO

1. Neo Clear 1: 10 minutos
2. Neo Clear 2: 10 minutos

HIDRATACION

3. Etanol 100% 1: 10 minutos
4. Etanol 100% 2: 10 minutos

BLOQUEO DE LA PEROXIDASA ENDOGENA

5. Metanol (200ml+ 4ml de agua oxigenada): 30 minutos

CONTINUACIÓN DE HIDRATACIÓN

6. Alcohol 96° 1: 5 minutos
7. Alcohol 96° 2: 5 minutos
8. Alcohol 70°: 5 minutos
9. Alcohol 50°: 5 minutos

LAVADO:

10. Lavado en PBS: 5 minutos
11. Lavado en PBS: 5 minutos
12. Lavado en PBS: 5 minutos

RECUPERACION ANTIGENICA:

13. Buffer citrato (estandarizar a ph 6 con HCl) en horno microondas a 750watts: 10 minutos
14. Dejar enfriar

LAVADO:

15. Lavado en PBS: 5 minutos
16. Lavado en PBS: 5 minutos

17. Lavado en PBS: 5 minutos

INACTIVACION DE UNIONES INESPECIFICAS:

18. Aplicar BSA 1% en cámara húmeda a temperatura ambiente: 30 minutos

ANTICUERPO PRIMARIO: (anticuerpo a trabajar, generalmente diluido 1:100)

19. Aplicar en toda la muestra en cámara húmeda y dejar reposar hasta el día siguiente en refrigeración.

LAVADO:

20. Lavado en PBS: 5 minutos

21. Lavado en PBS: 5 minutos

22. Lavado en PBS: 5 minutos

ANTICUERPO SECUNDARIO (según el kit para monoclonal o policlonal)

23. Aplicar en cámara húmeda y dejar reposar por 30 minutos a temperatura ambiente.

LAVADO:

24. Lavado en PBS: 5 minutos

25. Lavado en PBS: 5 minutos

26. Lavado en PBS: 5 minutos

ENZIMA AB (según el kit para monoclonal o policlonal):

27. Aplicar en cámara húmeda y dejar reposar por 30 minutos a temperatura ambiente.

LAVADO:

28. Lavado en PBS: 5 minutos

29. Lavado en PBS: 5 minutos

30. Lavado en PBS: 5 minutos

REVELADO:

31. Aplicar DAB... hasta observar marcación y apuntar el tiempo que demoró en marcar... cortar la reacción con agua corriente.

ENJUAGUE:

32. Lavado en agua corriente: 5 minutos

33. Lavado en agua destilada: 5 minutos

COLORACIÓN DE CONTRASTE:

34. Hematoxilina de Harris: 5 segundos y enjuagar en agua corriente para eliminar el excedente de colorante.

FIJACIÓN DEL COLORANTE:

35. Agua corriente: 5 minutos

ENJUAGUE:

36. Agua destilada: 5 minutos

DESHIDRATACIÓN:

37. Alcohol 50°: 5 minutos

38. Alcohol 70°: 5 minutos

39. Alcohol 96° 1: 5 minutos

40. Alcohol 96° 2: 5 minutos

41. Etanol 100% 1: 5 minutos

42. Etanol 100% 2: 5 minutos

43. Neo Clear 1: 5 minutos

44. Neo Clear 2: 5 minutos

MONTAJE:

45. Neomont o Bálsamo de Canadá: 10 segundos. Limpieza de la lámina después de 48 horas con Neo Clear para retirar restos de pegamento.